



**Inês Nogueira Ramos**

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

## **Estudo da Concentração Elemental em Tecidos Biológicos: Trigo e Eucalipto**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores: Prof. Doutor Mauro Guerra,  
Professor Auxiliar Convidado,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNL

Prof. Doutor José Paulo Santos,  
Professor Associado com Agregação,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia - UNL

Júri:

Presidente: Doutora Carla Maria Quintão Pereira,  
Professora Auxiliar, FCT-UNL

Arguente: Doutor Mário Emanuel Campos de Sousa Diniz,  
Professor Auxiliar Convidado, FCT-UNL

Vogal: Doutor Mauro António Moreira Guerra,  
Professor Auxiliar Convidado, FCT-UNL



Estudo da Concentração Elementar em Tecidos Biológicos: Trigo e Eucalipto

Direitos de Cópia © Inês Nogueira Ramos, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



Aos meus pais, Emília e José



# Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus orientadores, Professor Doutor Mauro Guerra e Professor Doutor José Paulo Santos, sem os quais este trabalho não teria sido possível. Obrigado pelo apoio incondicional, pelos ensinamentos transmitidos, pela disponibilidade e incentivo que demonstraram desde o primeiro dia.

Agradeço também aos colaboradores do Departamento de Ciências da Terra da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, nomeadamente à Doutoranda Inês Maria Pataco, ao Professor Doutor Fernando Lidon, ao Doutorando João Pelica, ao Professor Doutor Fernando Reboredo e à Professora Doutora Maria Fernanda Pessoa, por me fornecerem todo o material de estudo para a realização deste trabalho, pela disponibilidade e pelos conhecimentos fundamentais que me transmitiram.

O meu agradecimento ao LIBPhys-UNL pela disponibilização do laboratório e de todo o material necessário para a realização deste trabalho. Quero também agradecer a todas as pessoas com quem partilhei o laboratório, em especial, à Alexandra Silva, à Marta Carvalho e à Adriana Costa, pela força, pela ajuda, pela amizade e companheirismo vivido dentro e fora do laboratório.

Agradeço aos amigos com quem partilhei estes últimos cinco anos, que celebraram comigo as minhas vitórias e me ajudaram a superar as derrotas. Muito obrigado pelo apoio, pelo carinho e, acima de tudo, pela amizade verdadeira que sempre demonstraram. Foram, sem dúvida, uma segunda família para mim. Um agradecimento especial ao meu namorado por todo o apoio que me deu nos momentos mais difíceis, pela paciência, pelo carinho e por me fazer sempre acreditar que era possível.

A toda a família e amigos, que embora distantes, nunca deixaram de se preocupar comigo, nem de me apoiarem nos piores momentos. Um muito obrigado pelo carinho, pelo apoio e pelo facto de demonstrarem que a distância era apenas uma barreira física.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer do fundo do coração aos meus pais por tornarem este sonho realidade. Muito obrigado pelo apoio e carinho que sempre me deram, por estarem ao meu lado em todas as minhas decisões. Obrigado por todo o vosso sacrifício.

Mais uma vez, a todos os meus sinceros agradecimentos.





# Resumo

As deficiências nutricionais resultantes da ausência de micronutrientes, como o ferro (Fe) e o zinco (Zn), essenciais para o crescimento e desenvolvimento humano são responsáveis por um profundo impacto no sistema imunitário da população mundial. No entanto, os problemas da má nutrição não se restringem apenas à saúde afetando, também, a economia global. A biofortificação revela-se como uma possível solução para minimizar os défices nutricionais existentes atualmente. Esta estratégia consiste no melhoramento nutricional das culturas agrícolas através, por exemplo, da aplicação de fertilizantes com micronutrientes essenciais, sem comprometer a produtividade dessas culturas.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a eficácia da biofortificação aplicada em duas espécies de grãos de trigo utilizando uma metodologia analítica denominada micro espectroscopia de fluorescência de raios-X ( $\mu$ -EDXRF). Baseada na emissão de raios-X característicos, esta técnica foi utilizada para mapear e quantificar os elementos presentes nos grãos de trigo.

Através dos mapas de distribuição espacial dos elementos, foi possível verificar que, independentemente da espécie do grão de trigo biofortificada, os macro e micronutrientes localizam-se, essencialmente, no embrião e nas diversas camadas que constituem a parte exterior do grão (farelo). Esta localização dos nutrientes no grão permitirá a obtenção de farinha (no caso do trigo mole) ou semolina (no caso do trigo duro), ambas integrais, destinadas ao consumo humano.

Com base nos dados quantitativos obtidos através da técnica de espectrofotometria de absorção atômica (AAS), foi possível observar que, entre os diferentes tratamentos de adubação aplicados sobre a espécie de *Triticum durum* Desf. cv Marialva (trigo duro), o tratamento correspondente à adição de 30 mL de uma solução nutritiva completa revelou-se o mais eficaz no processo da biofortificação dos grãos de trigo, registando uma acumulação significativa de nutrientes e uma elevada produção de biomassa.

Neste trabalho foi, também, investigada a possibilidade de se utilizar o eucalipto como agente de limpeza de terrenos contaminados com arsénio (As). No entanto, os dados preliminares obtidos permitem-nos concluir que a técnica de  $\mu$ -EDXRF não é a mais indicada para realizar este tipo de investigação.

Palavras chave: Nutrientes, Deficiências nutricionais, Biofortificação, Grãos de trigo,  $\mu$ -EDXRF, AAS, Eucalipto, Contaminação



# Abstract

Nutritional deficiencies resultant from the absence of micronutrients, such as iron (Fe) and zinc (Zn), essential for the growth and development of the human being, are responsible for a profound impact on the immune system of the worldwide population. Although, malnutrition problems are not only related to health, affecting also the global economy. The biofortification unravels as a possible solution to minimize the existing nutritional problems. This strategy consists on the nutritional enhancement of agricultural crops through the application of fertilizers with essential micronutrients, without compromising the productivity of this crops.

The objective of this work was to evaluate the efficiency of biofortification applied to two wheat grain species, utilizing for that an analytical methodology denominated micro energy dispersive X-ray fluorescence ( $\mu$ -EDXRF). Based on the emission characteristic X-rays, this technique was used to map and quantify the elements present in wheat grains.

Through the elements special distribution maps, it was possible to verify that, independently from the biofortified wheat grain specie, the macro and micronutrients are located essentially, at the embryo and in the many layers that constitute the outer part of the grain (bran). The grain nutrients localization will allow to obtain flour (in the case of the soft wheat) or semolina (in the case of durum wheat), both whole, for human consumption.

Based on the quantified data obtained by using the technique of atomic absorption spectrometry (AAS), it was possible to see that, between the different fertilization treatments applied on the specie of *Triticum durum* Desf. cv Marialva (durum wheat), the treatment corresponding to the addition of 30 mL of a complete nutritive solution as shown more effective in the wheat grains biofortification process, registering a significant accumulation of nutrients and an high biomass production.

In this work it was also investigated the possibility of using eucalyptus as a cleaning agent for soils contaminated with arsenic (As). Although, the obtained preliminary data allow us to conclude that this  $\mu$ -EDXRF technique may not be the most indicated to accomplish this type of investigation.

Keywords: Nutrients, Nutritional deficiencies, Biofortification, Wheat grains,  $\mu$ -EDXRF, AAS, Eucalyptus, Contamination



# Conteúdo

Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de figuras	xvii
Lista de tabelas	xxi
Lista de símbolos	xxiii
Lista de siglas	xxv
1 Introdução	1
2 Contextualização do Problema	3
2.1 A Situação em Portugal . . . . .	4
2.2 A Deficiência de Micronutrientes: Ferro e Zinco . . . . .	4
2.2.1 Ferro . . . . .	5
2.2.2 Zinco . . . . .	5
2.3 Possíveis Soluções para o Problema . . . . .	6
2.3.1 Fortificação . . . . .	6
2.3.2 Biofortificação . . . . .	7
2.4 Caracterização das Amostras em Estudo . . . . .	9
2.4.1 Trigo . . . . .	9
2.4.2 Estrutura do grão . . . . .	10
3 Técnica Experimental	13
3.1 Produção de Raios-X . . . . .	13
3.2 Processos de Interação dos Raios-X com a Matéria . . . . .	14

3.2.1	Efeito Fotoelétrico . . . . .	15
3.2.2	Fenómenos de Dispersão . . . . .	16
3.3	Espetroscopia de Raios-X . . . . .	17
3.3.1	Espetroscopia de Fluorescência de Raios-X . . . . .	17
3.3.2	Análise Qualitativa e Quantitativa . . . . .	21
4	Procedimento Experimental . . . . .	25
4.1	Material Biológico . . . . .	25
4.2	Implementação das Culturas de Trigo . . . . .	25
4.3	Preparação das Amostras para Análise por $\mu$ - EDXRF . . . . .	27
4.4	Preparação das Amostras para Análise por Espectrofotometria de Absorção Atômica . . . . .	27
4.4.1	Determinação do Peso Seco . . . . .	27
4.5	Espetrômetro de $\mu$ - EDXRF . . . . .	28
4.6	Incertezas Associadas à Técnica de $\mu$ - EDXRF . . . . .	28
4.7	Exatidão do Método Analítico . . . . .	30
5	Apresentação e Discussão dos Resultados . . . . .	33
5.1	Análise Qualitativa . . . . .	33
5.1.1	Distribuição Elementar nos Grãos de Trigo . . . . .	33
5.2	Análise Quantitativa . . . . .	35
5.2.1	Análise por $\mu$ - EDXRF . . . . .	35
5.2.2	Análise por Espectrofotometria de Absorção Atômica . . . . .	41
6	Eucalipto . . . . .	49
6.1	Contaminação dos Solos . . . . .	49
6.2	Fitorremediação . . . . .	49
6.3	Material Biológico . . . . .	50
6.4	Implementação das Culturas de Eucalipto . . . . .	51
6.5	Preparação das Amostras para Análise por $\mu$ -EDXRF . . . . .	51
6.6	Resultados . . . . .	51
7	Conclusões e Perspectivas . . . . .	55
	Bibliografia . . . . .	57
	Apêndice A Vitaminais e Minerais . . . . .	63

---

Apêndice B	Mapeamentos do Grão de Trigo	65
Apêndice C	Dados Associados à Técnica de $\mu$ -EDXRF: Trigo	71
Apêndice D	Dados Associados à Técnica de Espectrofotometria de Absorção Atômica	77
Apêndice E	Dados Associados à Técnica de $\mu$ -EDXRF: Eucalipto	85





# Lista de Figuras

2.1	Ferramenta interativa <i>online</i> relativa às prioridades da biofortificação dos alimentados a nível mundial. . . . .	8
2.2	Representação das diversas estruturas físicas que constituem um grão de trigo. . . . .	10
2.3	Imagem do mapeamento de um grão de trigo obtida através do espectrómetro de $\mu$ -EDXRF. . . . .	11
3.1	Emissão de radiação de travagem ( <i>Bremsstrahlung</i> ) como resultado da desaceleração de uma partícula carregada de elevada energia. . . . .	13
3.2	Emissão de um fóton de raios-X característico resultante da transição eletrónica. . . . .	14
3.3	Probabilidade das transições radiativas e não radiativas em função do número atómico. . . . .	15
3.4	Ilustração da dispersão de Compton (dispersão inelástica). . . . .	16
3.5	Representação do rendimento de fluorescência ( $\omega_i$ ) em função do número atómico (Z) e das camadas eletrónicas (i = K, L, M). . . . .	18
3.6	Ilustração de um espectrómetro de XRF composto pelo sistema de excitação, pela amostra em estudo e pelo sistema de deteção. . . . .	19
3.7	Espectro de emissão de raios-X do molibdénio excitado por eletrões de 35 KeV. . . . .	20
3.8	Espectro de um grão de trigo fortificado com 90 mL de uma solução nutritiva, obtido através do espectrómetro de $\mu$ -EDXRF. . . . .	22
4.1	Reta de calibração para o ferro (Fe) obtida a partir da análise dos materiais de referência GBW 07603, GBW 07604 e NBS 1571. . . . .	30
5.1	Imagens da distribuição espacial do Fe no grão de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro) para os tratamentos de adubação com 15 mL e 90 mL da solução nutritiva completa. . . . .	33
5.2	Imagens da distribuição espacial do zinco (Zn) no grão de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole) proveniente de sementes de diferentes gerações. . . . .	34
5.3	Imagens do mapeamento de um grão de trigo mole biofortificado, obtidas através da técnica de $\mu$ -EDXRF, onde através de um sistema de cores é possível observar a localização dos diversos minerais. . . . .	35

5.4	Comparação da concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação no farelo de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro). . . . .	36
5.5	Comparação da concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação no escutelo do embrião de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro). . . . .	36
5.6	Comparação da concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação na radícula do embrião de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro). . . . .	37
5.7	Comparação da concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação na nervura do grão de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro). . . . .	38
5.8	Comparação da concentração elementar obtida no farelo para os grãos de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações. . . . .	39
5.9	Comparação da concentração elementar obtida no escutelo para os grãos de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações. . . . .	39
5.10	Comparação da concentração elementar obtida na radícula para os grãos de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações. . . . .	40
5.11	Comparação da concentração elementar obtida na nervura para os grãos de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações. . . . .	40
5.12	Concentração média de micronutrientes na raiz em função dos diferentes tempos de colheita. . . . .	42
5.13	Concentração média de micronutrientes na parte aérea em função dos diferentes tempos de colheita. . . . .	43
5.14	Concentração média de macronutrientes na raiz em função dos diferentes tempos de colheita. . . . .	45
5.15	Concentração média de macronutrientes na parte aérea em função dos diferentes tempos de colheita. . . . .	46
6.1	Processo de interação solo-planta presente na espécie vegetal do género <i>Eucalyptus</i> . .	50
6.2	Comparação da concentração elementar obtida na raiz da espécie <i>Eucalyptus globulus</i> contaminada com 100 $\mu\text{g/g}$ de As. . . . .	52
6.3	Comparação da concentração elementar obtida na raiz da espécie <i>Eucalyptus globulus</i> contaminada com 200 $\mu\text{g/g}$ de As. . . . .	52
6.4	Comparação da concentração elementar obtida na raiz da espécie <i>Eucalyptus nitens</i> contaminada com 100 $\mu\text{g/g}$ de As. . . . .	53
6.5	Comparação da concentração elementar obtida na raiz da espécie <i>Eucalyptus nitens</i> contaminada com 200 $\mu\text{g/g}$ de As. . . . .	53
B.1	Imagens da distribuição do P no grão de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro) para os tratamentos de adubação com 15 mL e 90 mL da solução nutritiva completa. . . . .	65

B.2	Imagens da distribuição do K no grão de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro) para os tratamentos de adubação com 15 mL e 90 mL da solução nutritiva completa. . . . .	65
B.3	Imagens da distribuição do Ca no grão de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro) para os tratamentos de adubação com 15 mL e 90 mL da solução nutritiva completa. . . . .	66
B.4	Imagens da distribuição do Zn no grão de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro) para os tratamentos de adubação com 15 mL e 90 mL da solução nutritiva completa. . . . .	66
B.5	Imagens da distribuição do Mn no grão de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro) para os tratamentos de adubação com 15 mL e 90 mL da solução nutritiva completa. . . . .	67
B.6	Imagens da distribuição do P no grão de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole) proveniente de sementes de controlo e sementes da 4 <sup>o</sup> progenitura. . . . .	67
B.7	Imagens da distribuição do K no grão de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole) proveniente de sementes de controlo e sementes da 4 <sup>o</sup> progenitura. . . . .	68
B.8	Imagens da distribuição do Ca no grão de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole) proveniente de sementes de controlo e sementes da 4 <sup>o</sup> progenitura. . . . .	68
B.9	Imagens da distribuição do Fe no grão de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole) proveniente de sementes de controlo e sementes da 4 <sup>o</sup> progenitura. . . . .	69
B.10	Imagens da distribuição do Mn no grão de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole) proveniente de sementes de controlo e sementes da 4 <sup>o</sup> progenitura. . . . .	69



# Lista de Tabelas

4.1	Comparação das concentrações dos elementos medidos na amostra padrão Bush Branches GBW 07603 com os respectivos valores certificados. . . . .	31
4.2	Comparação das concentrações dos elementos medidos na amostra padrão Poplar Leaves GBW 07604 com os respectivos valores certificados. . . . .	31
4.3	Comparação das concentrações dos elementos medidos na amostra padrão Orchard Leaves NBS 1571 com os respectivos valores certificados. . . . .	32
5.1	Biomassa seca da raiz obtida para cada um dos tratamentos de adubação ao longo dos diferentes períodos experimentais. . . . .	48
5.2	Biomassa seca da parte aérea obtida para cada um dos tratamentos de adubação ao longo dos diferentes períodos experimentais. . . . .	48
6.1	Concentração de As presente nas raízes da espécie <i>Eucalyptus globulus</i> e <i>Eucalyptus nitens</i> , ambas contaminadas com 100 µg/g e 200 µg/g de As. . . . .	54
6.2	Concentração de As presente nas folhas da espécie <i>Eucalyptus globulus</i> e <i>Eucalyptus nitens</i> , resultantes da contaminação com 100 µg/g e 200 µg/g de As. . . . .	54
A.1	Minerais e vitaminas utilizadas na fortificação dos alimentos. . . . .	63
C.1	Dados relativos à concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação no farelo de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro) . . . . .	71
C.2	Dados relativos à concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação no escutelo do embrião de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro) . . . . .	72
C.3	Dados relativos à concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação na radícula do embrião de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro) . . . . .	72
C.4	Dados relativos à concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação na nervura de <i>Triticum durum</i> Desf. (trigo duro) . . . . .	73
C.5	Dados relativos à concentração elementar obtida no farelo para os grãos de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações. . . . .	73

C.6	Dados relativos à concentração elementar obtida no escutelo para os grãos de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações. . . . .	74
C.7	Dados relativos à concentração elementar obtida na radícula para os grãos de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações. . . . .	74
C.8	Dados relativos à concentração elementar obtida na nervura para os grãos de <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações. . . . .	75
D.1	Concentração média dos micronutrientes Fe, Cu, Mn e Zn na raiz da planta de trigo duro. . . . .	77
D.2	Concentração média dos micronutrientes Fe, Cu, Mn e Zn na parte aérea da planta de trigo duro. . . . .	78
D.3	Concentração média dos macronutrientes Ca, K, Mg e P na raiz da planta de trigo duro. . . . .	79
D.4	Concentração média dos macronutrientes Ca, K, Mg e P na parte aérea da planta de trigo duro. . . . .	80
D.5	Acumulação total de micronutrientes na raiz, parte aérea e grão de trigo. . . . .	81
D.6	Acumulação total de macronutrientes na raiz, parte aérea e grão de trigo. . . . .	83
E.1	Concentração dos elementos presentes na raiz da espécie <i>Eucalyptus globulus</i> aos 2 e aos 4 meses, após a contaminação do solo com 100 $\mu\text{g/g}$ de As. . . . .	85
E.2	Concentração dos elementos presentes na raiz da espécie <i>Eucalyptus globulus</i> aos 2 e aos 4 meses, após a contaminação do solo com 200 $\mu\text{g/g}$ de As. . . . .	86
E.3	Concentração dos elementos presentes na raiz da espécie <i>Eucalyptus nitens</i> aos 2 e aos 4 meses, após a contaminação do solo com 100 $\mu\text{g/g}$ de As. . . . .	86
E.4	Concentração dos elementos presentes na raiz da espécie <i>Eucalyptus nitens</i> aos 2 e aos 4 meses, após a contaminação do solo com 200 $\mu\text{g/g}$ de As. . . . .	87
E.5	Concentração dos elementos presentes na folha da espécie <i>Eucalyptus nitens</i> aos 2 meses, após a contaminação do solo com 200 $\mu\text{g/g}$ de As. . . . .	87

# Lista de Símbolos

$\nu$  - Frequência do Fóton

$\mu$  - Coeficiente linear de atenuação

$\rho$  - Densidade

$\theta$  - Ângulo de Deflexão

$\sigma$  - Desvio Padrão

Al - Alumínio

A - Ampère

Be - Berílio

bar - Unidade de Pressão

$c$  - Velocidade da Luz no Vácuo

C - Constante relacionada com o material constituinte do ânodo

Ca - Cálcio

Cu - Cobre

Cl - Cloro

$E$  - Energia do Fóton

$E_c$  - Energia Cinética do Elétron

eV - ElétronVolt

Fe - Ferro

g - Grama

$h$  - Constante de Planck

$I_x$  - Intensidade Final do Feixe

$I_0$  - Intensidade Inicial do Feixe

$I'$  - Intensidade das Linhas Características

$I''$  - Intensidade Total do Espectro Contínuo

$i'$  - Corrente no Tubo de Raios-X

K - Potássio

$K_\alpha$  - Grupo de riscas mais intensas da série K do espectro descontínuo de raios-X

$K_\beta$  - Grupo das segundas riscas mais intensas da série K do espectro descontínuo de raios-X

$k$  - Constante que inclui a corrente do tubo de raios-X

L - Litro

Mn - Manganês

Mg - Magnésio

$m_0$  - Massa do Eletrão em Repouso

m - Metro

mS - Mili-Siemens

$N$  - Número de medições efetuadas

P - Fósforo

$P_R$  - Probabilidade da transição radiativa

$P_{NR}$  - Probabilidade da transição não radiativa

ppm - Partes por milhão

Rh - Ródio

Se - Selênio

Si - Silício

Ti - Titânio

$V_c$  - Tensão Crítica

$V$  - Tensão

$W_0$  - Energia de Ligação do Eletrão

$\omega$  - Rendimento de Fluorescência

$\overline{X}_p$  - Média ponderada pela incerteza de medição de cada ponto individual

$X_i$  - Concentração de um ponto individual

$x$  - Espessura

$Z$  - Número Atômico

Zn - Zinco

Zr - Zircônio



# Lista de Siglas e Acrónimos

$\mu$ -EDXRF - *Micro Energy Dispersive X-Ray Fluorescence* (Micro Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia)

*cf.* - Confrontar

*et al.* - *et alli* (e outros)

AAS - *Atomic Absorption Spectrometry* (Espectrofotometria de Absorção Atômica)

BPI - *Biofortification Priority Index* (Índice de Prioridade de Biofortificação)

CGIAR - *Consultative Group for International Agricultural Research* (Grupo de Consultoria em Pesquisa Agrícola Internacional)

DBM - *Double Burden of Malnutrition* (Dupla Incidência da Má Nutrição)

DCT - Departamento de Ciências da Terra

DGS - Direcção-Geral da Saúde

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DW - *Dry Weight* (Peso Seco)

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura)

FCT-UNL - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

FWHM - *Full Width at Half Maximum* (Largura a Meia Altura)

HV - *High Voltage* (Alta Tensão)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PIB - Produto Interno Bruto

PNPAS - Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável

RNA - *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

SDD - *Silicon Drift Detector*

SRM - *Standard Reference Materials* (Materiais de Referência)

UNICEF - *The United Nations Children's Fund* (Fundo das Nações Unidas para a Infância)

USD - *United States Dollar* (Dólar Americano)

WDXRF - *Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence* (Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Comprimento de Onda)

XRF - *Fluorescence X-Ray*

# Capítulo 1

## Introdução

As deficiências nutricionais, resultantes da ausência de micronutrientes essenciais, são responsáveis por um profundo impacto no sistema imunitário das populações, constituindo assim um problema de saúde pública a nível mundial com graves consequências para a economia global. As populações mais afetadas por este problema encontram-se, essencialmente, nos países em desenvolvimento, sendo os recém-nascidos, as crianças e as mulheres grávidas ou em período de amamentação os grupos mais vulneráveis ao défice de micronutrientes.

Os micronutrientes como o ferro, o zinco, o ácido fólico, a vitamina A, entre outros, apresentam esta designação uma vez que são, apenas, necessários em quantidades diminutas (menores ou iguais a 18 mg/dia) [1]. Quando ingeridos em quantidades suficientes, embora reduzidas, permitem que o organismo produza enzimas, hormonas e outras substâncias essenciais para um crescimento e desenvolvimento adequado. Os micronutrientes podem ser encontrados, naturalmente, numa variedade de alimentos de origem animal ou em frutas e vegetais. No entanto, já é possível sintetizá-los em laboratório [2]. A ingestão adequada destes micronutrientes, conseguida através de uma dieta diversificada, pode distinguir uma vida saudável e produtiva de uma vida repleta de doenças.

De forma a solucionar estas deficiências nutricionais, tornou-se necessário recorrer a determinadas práticas que permitem aumentar a quantidade de micronutrientes em alimentos de primeira necessidade, como é o caso do trigo, um dos cereais mais consumidos a nível mundial e com uma elevada importância uma vez que se trata de uma fonte de energia, proteína e fibra dietética [3]. Desta forma, entre as várias estratégias existentes atualmente para minimizar os défices nutricionais, a biofortificação revela-se como uma possível solução. Esta estratégia consiste no melhoramento nutricional das culturas agrícolas através, por exemplo, da aplicação de fertilizantes constituídos por micronutrientes essenciais, sem comprometer a produtividade dessas culturas. Ao contrário das restantes intervenções nutricionais, como é o caso da suplementação ou da fortificação, esta caracteriza-se por ser uma prática mais sustentável e menos dispendiosa [4].

O objetivo deste trabalho é o de efetuar análises elementais de forma a observar a distribuição dos macro e micronutrientes em grãos de trigo, bem como, proceder à sua quantificação antes e depois da biofortificação. Para tal, e de forma a avaliar a eficácia desta intervenção nutricional, foi utilizada uma metodologia analítica designada micro espectroscopia de fluorescência de raios-X dispersiva em energia ( $\mu$  - EDXRF, do inglês “*Micro Energy Dispersive X-Ray Fluorescence*”). Esta técnica,

baseada na emissão de raios-X característicos, permite obter informação qualitativa e quantitativa dos elementos (com  $Z > 11$ ) presentes na amostra em estudo. Trata-se, assim, de uma alternativa a outras técnicas, como é o caso da espectrofotometria de absorção atômica (AAS - *Atomic Absorption Spectrometry*), utilizada nos dias de hoje devido aos seus baixos custos e à sua seletividade. No entanto, a AAS trata-se de uma técnica que não permite uma análise multielementar em simultâneo. É, ainda, objetivo deste trabalho investigar a transferência solo-planta dos macro e micronutrientes, bem como, a eficácia deste tipo de intervenção nutricional na produção de fórmulas infantis ou de determinados alimentos destinados a um grupo específico da população.

A migração de elementos tóxicos, como é o caso do arsénio (As), do solo para a planta, mais concretamente para o eucalipto é, também, um tema investigado neste trabalho, com o objectivo de avaliar o potencial desta espécie na “limpeza” de solos contaminados com este tipo de metal pesado. Para tal, recorreu-se à técnica de  $\mu$ -EDXRF, sendo que os resultados obtidos são, ainda, bastante preliminares.

Esta dissertação está dividida em sete capítulos. O capítulo I apresenta algumas definições essenciais, uma breve introdução sobre o problema em estudo e os objetivos principais do trabalho desenvolvido. O capítulo II corresponde à contextualização do problema, dando particular destaque à deficiência de micronutrientes como o ferro (Fe) e o zinco (Zn) e às possíveis soluções para eliminar o problema em causa. São, ainda, abordados alguns aspectos característicos associados aos grãos de trigo. No capítulo III são abordados os conceitos teóricos, assim como, os princípios físicos subjacentes à técnica de espectroscopia de raios-X, dando particular atenção à espectroscopia de fluorescência de raios-X. O capítulo IV contém a descrição do procedimento experimental, nomeadamente, o modo de implementação e preparação das amostras biológicas, a explicação do método aplicado para minorar os erros associados à técnica de  $\mu$  - EDXRF e, ainda, a análise da exatidão do método analítico utilizado neste trabalho. No capítulo V são apresentados e discutidos os resultados obtidos através das técnicas de  $\mu$  - EDXRF e espectrofotometria de absorção atômica (AAS - *Atomic Absorption Spectrometry*), por via húmida. O capítulo VI contém as informações relevantes do estudo preliminar do eucalipto na limpeza de solos contaminados com As. Por fim, no capítulo VII são apresentadas as conclusões de todo o trabalho desenvolvido.

Paralelamente à execução deste trabalho e com o objetivo de estabelecer sinergias com um outro departamento da faculdade e, ao mesmo tempo, desenvolver e aperfeiçoar as minhas capacidades de análise realizou-se, também, o estudo da distribuição dos macro e micronutrientes em grãos de arroz biofortificados com selénio (Se), assim como, em grãos de trigo biofortificados com casca de ovo. Ambos os estudos foram realizados no âmbito de projetos levados a cabo pelo Departamento de Ciências da Terra (DCT) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL).

## Capítulo 2

# Contextualização do Problema

A má nutrição resultante da ausência de micronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento humano, constitui um problema de saúde pública a nível mundial. No entanto, as populações mais afetadas encontram-se, essencialmente, nos países em desenvolvimento onde a pobreza tem sido apontada como uma das principais causas subjacentes à insegurança alimentar e nutricional. Conjuntamente, a ignorância e a falta de informação acerca da nutrição têm contribuído para o problema [5, 6].

As estimativas da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) demonstraram que mais de 840 milhões de pessoas permanecem numa situação de “insegurança alimentar” [5]. Outras estimativas revelaram, ainda, que mais de 20 milhões de bebés (ou seja, 15% dos bebés a nível global) nasceram em 2011 com um peso abaixo do normal (inferior a 2500 gramas), o que traduz o estado de subnutrição vivido pela mãe durante o período de gestação [7]. Contrariamente a este cenário, 1,6 mil milhões de adultos em todo o mundo (de um total de 6,5 mil milhões de pessoas [8]) sofrem de excesso de peso, sendo que para 2015 se prevê um aumento deste número para os 2,3 mil milhões de pessoas. Um facto ainda mais preocupante é a quantidade de crianças, aproximadamente 20 milhões, com menos de cinco anos de idade que sofrem de excesso de peso [5].

Embora seja uma situação que, em primeira análise, aparente ser pouco provável de ocorrer, dada a sua contrariedade, a verdade é que a subnutrição e a sobrenutrição são possíveis de coexistir no mesmo grupo populacional ou até mesmo no próprio indivíduo, como é o caso das pessoas que sofrem, simultaneamente, de obesidade e anemia. Este fenómeno, denominado por “dupla incidência da má nutrição” (DBM - *Double Burden of Malnutrition*) [5], é uma realidade de muitos países em desenvolvimento, onde a maior parte da população não tem acesso a uma quantidade adequada de fruta, vegetais, carne e peixe, alimentos onde a presença de micronutrientes é elevada. Em alternativa surgem alimentos como o arroz, o pão e a massa, ricos em calorias mas pobres em nutrientes [9].

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, em todo o mundo, mais de 2 mil milhões de pessoas são afetadas por deficiências nutricionais (carência de vitamina A, iodo, ferro e zinco). Apesar destas deficiências afetarem todas as faixas etárias da população, existem grupos mais vulneráveis, como é o caso dos recém-nascidos, crianças e mulheres grávidas e/ou em período de amamentação [6].

Para além das múltiplas complicações ao nível da saúde, a débil nutrição de micronutrientes

tem um impacto significativo na economia. A *Micronutrient Initiative* e o *World Bank* estimam que os países mais afetados pelo déficit de micronutrientes podem perder entre 2% a 3% do seu Produto Interno Bruto (PIB), por ano, devido a esta insuficiência [2].

De acordo com o relatório de 2008 sobre a Criação de Valor Partilhado apresentado pela empresa da Nestlé, “os custos da má nutrição para a saúde excedem atualmente os da obesidade.” Isto ocorre pois as consequências subjacentes ao estado de má nutrição, nomeadamente a debilitação física das pessoas com idades avançadas, conduzem a um aumento no número de quedas e fraturas [5].

## 2.1 A Situação em Portugal

A Direção-Geral da Saúde (DGS), entidade responsável pela regulamentação, orientação e coordenação das atividades de promoção da saúde e prevenção da doença [10], aprovou em 2012 o Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável (PNPAS) com o objetivo de melhorar o estado nutricional da população portuguesa, sendo este parâmetro potenciador de impactos diretos não só na prevenção, como também, no controlo das doenças com maior incidência a nível nacional (doenças cardiovasculares, oncológicas, diabetes e obesidade) [11].

Com base no relatório da DGS [11], é possível verificar que uma parte significativa do consumo alimentar da população portuguesa recai sobre os cereais e produtos à base de cereais, ocupando a segunda posição no que diz respeito às despesas das famílias em produtos alimentares, logo a seguir ao consumo de carne e derivados. Desta forma, sendo os cereais produtos alimentares consumidos regularmente e em quantidades consideráveis tornam-se, assim, excelentes veículos de fortificação.

Os atuais preços dos produtos alimentares, aliados aos baixos rendimentos auferidos pela população portuguesa resultam numa redução do poder de compra, sendo a classe com rendimentos mais baixos a principal afetada. Esta é apenas uma, entre várias, razões pelas quais se verifica a existência de insegurança alimentar entre a população. Outra causa apontada para a falta de alimentos é a dificuldade no acesso aos produtos, causa que, em pleno século XXI com os avanços que se assistem nas áreas das tecnologias, transportes e comunicações não deveria ser tão significativa. Assim sendo, os canais de distribuição atualmente existentes no nosso país deverão ser alvo de revisão por partes das entidades governamentais e empresariais, com a maior brevidade possível.

No que diz respeito às carências de ferro em Portugal é mencionado na Ref. [12] “O ferro é um mineral que necessita de recomendações em Portugal pela frequência da deficiência e suas consequências.”

## 2.2 A Deficiência de Micronutrientes: Ferro e Zinco

A má nutrição em termos de micronutrientes é originada pela deficiência de uma série de vitaminas e minerais na alimentação humana, tal como foi referido anteriormente na secção 2 sendo esta carência a grande responsável não só pelo atraso no desenvolvimento psico-motor das populações, como também, pelo elevado número de mulheres e crianças mortas por ano. No entanto, as carências de ferro e zinco são as que se encontram mais significativamente associadas as estas situações [12].

### 2.2.1 Ferro

O ferro (Fe) é um elemento essencial para a vida humana, estando presente em todas as células de um organismo vivo. A sua elevada importância está relacionada com a participação deste elemento em processos altamente complexos, como é o caso do transporte, do armazenamento e da utilização do oxigénio por parte do organismo. Desta forma, cerca de 70% do ferro existente no corpo humano encontra-se presente nos glóbulos vermelhos do sangue e nas células musculares. No entanto, pode também estar presente em proteínas e enzimas [13].

Com uma elevada importância no sistema imunitário das populações, com particular destaque para os recém-nascidos, crianças e mulheres, este elemento tem sido alvo de estudo a nível da absorção alimentar. Um desses estudos [14] foi realizado na Índia, onde a anemia causada por deficiências de ferro é um problema de saúde pública que afeta mais de metade (aproximadamente 56%) das raparigas adolescentes com idades compreendidas entre os 11 e os 18 anos. Tal ocorrência deve-se ao facto das necessidades de ferro, durante o período da adolescência, aumentarem drasticamente como resultado do aumento do volume sanguíneo, da massa muscular e início da menstruação [15, 16]. Tendo em consideração a dimensão do problema, o governo da Índia em parceria com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF - *The United Nations Children's Fund*) implementaram, no ano 2000, o Programa de Controlo da Anemia para Raparigas Adolescentes (do inglês, "*Adolescent Girls Anaemia Control Programme*") com o objectivo de reduzir a prevalência da anemia entre as raparigas adolescentes deste país. Os resultados obtidos da fase inicial do programa (decorrida entre 2000 e 2005) demonstraram que cerca de 80% das raparigas adolescentes que participaram no programa foram beneficiadas. De entre os vários benefícios, observou-se um melhoramento na capacidade física, na concentração, a existência de ciclos menstruais regulares, menos dores abdominais durante a menstruação, entre outros [14].

Em média, o valor de referência para ingestão de ferro por parte de uma mulher entre os 19 e os 50 anos é de 18 mg/dia diminuído, após este período, para os 8 mg/dia. No caso dos homens, as quantidades de ferro necessárias para o organismo são inferiores (8 mg/dia). Quanto aos recém-nascidos a quantidade de Fe adequada é de, apenas, 0,2 mg/dia (0-6 meses) e de 11 mg/dia (6-12 meses). Nas crianças e adolescentes a ingestão recomendada deste elemento varia entre os 9-10 mg/dia [17].

### 2.2.2 Zinco

O zinco (Zn) é um elemento bastante importante para a saúde humana encontrando-se, tal como o ferro, em quantidades consideráveis no organismo (cerca de 2 a 3 g), principalmente nos tecidos musculares, ossos, pâncreas e fígado [18]. Este mineral faz parte da constituição de um grande número de enzimas e estimula a atividade de outras, as quais atuam no crescimento e desenvolvimento do organismo, no funcionamento do sistema imunológico e respiratório e na reprodução. Dada a sua intervenção na síntese do ácido desoxirribonucleico (ADN ou DNA - *Deoxyribonucleic Acid*) e do ácido ribonucleico (ARN ou RNA - *Ribonucleic Acid*) torna-se, assim, um elemento de extrema importância em processos fisiológicos como a gravidez e o período de crescimento. Revela-se, ainda, importante no tratamento de problemas de pele, nomeadamente na cicatrização de feridas, sendo o seu carácter terapêutico conhecido desde o século XIX, quando já se utilizavam cremes constituídos por óxidos de zinco [13].

As principais fontes de zinco são os alimentos de origem animal, como as carnes vermelhas, ovos e laticínios. As frutas e os vegetais também possuem quantidades consideráveis deste elemento, no entanto o zinco presente nas proteínas das plantas não se encontra tão disponível para ser absorvido pelo organismo [18].

As quantidades de zinco necessárias por parte do organismo dependem de determinados fatores como a idade, o gênero e o estilo de vida. Em média, uma mulher adulta necessita de 8 mg/dia, enquanto que um homem adulto necessita de 11 mg/dia. As mulheres grávidas e/ou em período de amamentação têm necessidades de zinco superiores (entre os 11 mg/dia e os 13 mg/dia). Para os recém-nascidos as quantidades variam entre os 2-3 mg/dia, enquanto que para uma criança as quantidades situam-se entre os 3-8 mg/dia [18].

## 2.3 Possíveis Soluções para o Problema

Apresentam-se de seguida algumas soluções que poderão ser tidas em conta de forma a combater a má nutrição de micronutrientes. Essas soluções incluem [5]:

- Sistemas eficazes que permitam o controlo do setor alimentar, aliados a leis e regulamentos adequados;
- Programas de intervenção e educação pública sobre a importância da nutrição, alimentação saudável e exercício físico, com a colaboração das autoridades governamentais e de saúde locais;
- Suplementos alimentares destinados a grupos específicos de alto risco ou a pessoas em situação de emergência;
- Prática de uma agricultura sustentável com vista a melhorar a eficácia da produção alimentar, quer do ponto de vista quantitativo e qualitativo;
- Fortificação, distribuição e comercialização dos produtos alimentares;
- Biofortificação dos alimentos consumidos com maior regularidade pela população local, dada a existência de diferentes “lacunas” nutricionais nos consumidores de diversos países.

### 2.3.1 Fortificação

Segundo a Comissão do Codex Alimentarius <sup>1</sup> (do latim Código Alimentar [19]): “Fortificação ou enriquecimento consiste na adição de um ou mais nutrientes essenciais aos alimentos, quer estes contenham ou não os nutrientes adicionados, de forma a prevenir ou corrigir a deficiência demonstrada de um ou mais nutrientes na população ou em grupos específicos da população” [4](tradução do autor).

A adição de micronutrientes é um procedimento realizado por parte dos fabricantes de produtos alimentares de forma a repor o teor de nutrientes que foram perdidos durante os diversos processos a que estão sujeitos (transformação, armazenamento e manipulação) [20]. Desta forma, é aumentado o valor nutricional dos alimentos sem ser necessário que os consumidores mudem os seus hábitos

---

<sup>1</sup>Documento desenvolvido conjuntamente pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Consiste num conjunto de regras relativas à segurança dos alimentos com o objetivo de proteger a saúde dos consumidores e, simultaneamente, garantir práticas corretas no comércio alimentar.



de alimentação ou padrões de compra [21] permitindo, assim, ultrapassar alguns obstáculos que se encontram associados a outras intervenções, como é o caso da suplementação, que representa limitações logísticas e económicas [6].

De acordo com o artigo 3º do capítulo II da Ref. [20], existem certos requisitos no que diz respeito às vitaminas e minerais utilizados na fortificação dos alimentos. Assim sendo, só podem ser adicionados aos alimentos os nutrientes que figuram na lista presente no apêndice A. Existem, também, restrições nos alimentos que podem ser fortificados com micronutrientes, ficando de fora da lista de produtos enriquecidos alimentos como a fruta, os vegetais, a carne e o peixe. Bebidas com um grau alcoólico superior a 1,2% também não podem ser fortificadas [20].

A fortificação dos alimentos é aceite por organizações de saúde internacionais e regionais, como é o caso da OMS, UNICEF e Fundação Bill & Melinda Gates que aprovam a fortificação como um recurso essencial para melhorar a saúde nutricional das populações [21]. Os resultados obtidos pela *Internacional Food Information Council's Food & Health Survey* indicam que os consumidores se mostram receptivos a este método de enriquecimento nutricional, com cerca de um terço dos consumidores a acreditar que a fortificação tem um impacto moderado/excelente na saúde, enquanto um quarto admite que os alimentos fortificados têm um impacto no momento de compra [4].

A eficácia da fortificação pode ser vista através de alguns exemplos reais, como é o caso do Chile, onde a adição de ácido fólico à farinha de milho fez aumentar três a quatro vezes os níveis de folato no sangue de mulheres em período fértil [6].

Apesar de todas as vantagens referidas anteriormente, a fortificação dos alimentos caracteriza-se como uma prática que requer um investimento de capital considerável, operadores com qualificação técnica e métodos de análise suficientemente precisos de forma a garantir uma adição de micronutrientes em quantidades corretas e uniformes [4].

### 2.3.2 Biofortificação

De acordo com a Ref. [16], "O termo "Biofortificação" refere-se à estratégia onde as técnicas convencionais de melhoramento genético, a engenharia genética e as abordagens agronómicas, (...) são usadas de forma a melhorar o conteúdo nutricional e/ou a biodisponibilidade dos nutrientes nas culturas alimentares". Neste estudo optou-se pela biofortificação agronómica, em vez da biofortificação genética, pelo facto da abordagem agronómica apresentar resultados a curto prazo.

Uma das vantagens associada à biofortificação está relacionada com o facto das sementes, resultantes de culturas alimentares biofortificadas, poderem ser utilizadas durante os anos seguintes à biofortificação, pelo que, o investimento inicial resulta em benefícios a curto e médio prazo, sendo os custos recorrentes baixos [22]. Desta forma, e comparativamente à intervenção referida anteriormente, podemos concluir que a biofortificação se trata de uma prática mais sustentável e menos dispendiosa [4].

Resultados provenientes do estudo da concentração do germoplasma sugerem que o conteúdo de ferro e zinco nos alimentos de primeira necessidade pode duplicar através da biofortificação, melhorando, assim, a saúde de todos aqueles cuja ingestão destes micronutrientes se encontra abaixo do recomendado [22].

No âmbito do programa HarvestPlus<sup>2</sup> foi realizado um estudo onde foram utilizadas duas amostras diferentes de grãos de trigo, uma biofortificada com zinco ( $41 \mu\text{g/g Zn}$ ) e a outra não biofortificada ( $23,6 \mu\text{g/g Zn}$ ). Estas amostras foram inseridas, em quantidades iguais, na alimentação de vinte e sete mulheres adultas durante dois dias consecutivos. Os resultados revelaram uma maior absorção de zinco quando consumidas amostras de trigo biofortificadas, comparativamente ao consumo de amostras de trigo não biofortificadas, verificando-se um aumento de  $0,5 \text{ mg/dia}$  [24].

Foi recentemente disponibilizada uma ferramenta interativa *online* para todas as partes interessadas com objetivo de auxiliar as suas decisões sobre quais os alimentos a biofortificar, de acordo com as necessidades específicas de uma determinada população. Desta forma, surge o Índice de Prioridade de Biofortificação (BPI - *Biofortification Priority Index*) focado nos três principais micronutrientes - ferro, zinco e vitamina A - sendo possível aos utilizadores selecionar as potenciais regiões para investir. Com o recurso a um sistema de cores, o utilizador tem conhecimento do grau de prioridade da intervenção. Esta ferramenta, apresentada na figura 2.1, surge no momento em que a biofortificação está a conquistar cada vez mais um reconhecimento por parte das várias entidades competentes, como sendo uma estratégia viável para melhorar o estado nutricional das populações [25].

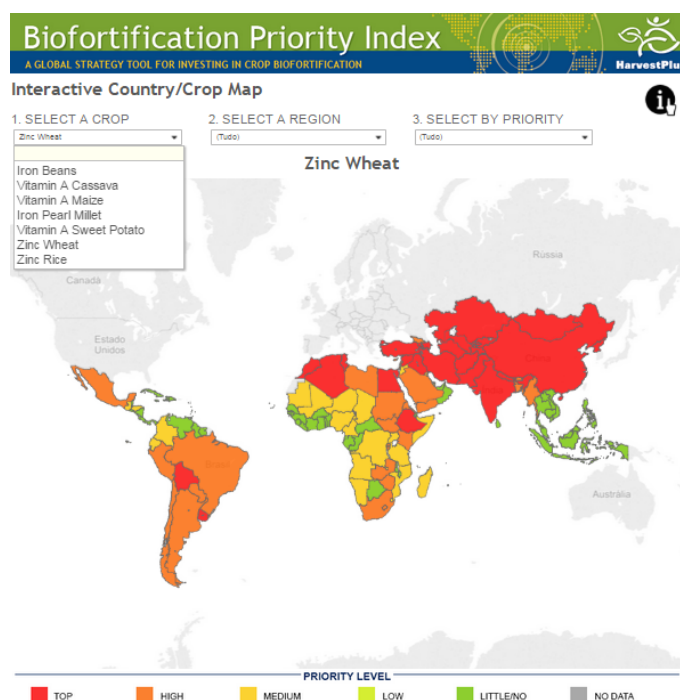


Figura 2.1: Ferramenta interativa *online*, onde através de um sistema de cores é possível conhecer as prioridades relativas à biofortificação de determinados alimentos a nível mundial. Ferramenta disponível em <http://www.ifpri.org/tools/bpimappingtool>. Consultada em: 22-01-2015

<sup>2</sup>HarvestPlus é um Programa de Desafios do Grupo de Consultoria em Pesquisa Agrícola Internacional (CGIAR - *Consultative Group for International Agricultural Research*) que tem como objectivo identificar as regiões onde combinações específicas de culturas e nutrientes podem ter um impacto mensurável na redução da fome oculta. É um programa interdisciplinar que envolve instituições académicas e de pesquisa, organizações da sociedade civil, governos e o sector privado, em mais de 40 países [23].

Um investimento de USD \$75 milhões (o que corresponde, aproximadamente, a 68 milhões de euros) permitiria, durante um ano, a suplementação de vitamina A para 37,5 milhões de crianças com idades pré-escolares no Bangladesh, Índia e Paquistão. O mesmo investimento aplicado na prática da fortificação permitiria, durante um ano, que 375 milhões de pessoas (cerca de 30% da população no Bangladesh, Índia e Paquistão) fossem beneficiadas por uma fortificação em ferro. Por sua vez, no que diz respeito à biofortificação, este investimento permitiria não só o desenvolvimento, como também a disseminação de variedades de arroz e trigo densos em ferro e zinco no sul da Ásia, podendo assim atingir uma população efetiva muito mais elevada do que a conseguida com a técnica de fortificação [9]. Desta forma, é possível verificar que a biofortificação é, entre as várias intervenções nutricionais, aquele que se revela como sendo a mais eficiente.

## 2.4 Caracterização das Amostras em Estudo

### 2.4.1 Trigo

O trigo é considerado como um dos cereais mais importantes a nível mundial, tratando-se de uma fonte de energia, proteína e fibra dietética. Este cereal, pertencente ao género *Triticum*, é constituído por várias espécies agrupadas em três grupos com diferentes configurações: diplóides (2n), tetraplóides (4n) e hexaplóides (6n), resultando numa composição cromossómica de 14, 28 ou 42 cromossomas, respetivamente [26]. A letra  $n$  corresponde ao número de cromossomas característico de cada espécie (no caso do trigo,  $n = 7$ ).

Em função do conteúdo proteico, propriedade que está associada à dureza do grão de trigo, e das suas aplicações, podemos distinguir duas espécies de trigo, o trigo mole (*Triticum aestivum* L. ssp. *Vulgare*) e o trigo duro (*Triticum turgidum* L. Thell. ssp. *durum*. Desf.). O trigo mole, constituído por 42 cromossomas, é utilizado, essencialmente, na panificação e pastelaria, enquanto o trigo duro, constituído por 28 cromossomas, é utilizado na produção de massas alimentícias [27] consumidas, maioritariamente, na Europa e América do Norte [28].

De acordo com as estatísticas agrícolas de 2013, publicadas pelo Instituto Nacional de Estatística, em Portugal, o trigo mole é cultivado em 44075 hectares com uma produção anual de 78200 toneladas, sendo a região do Alentejo aquela onde se verifica uma maior oferta nacional deste cereal, com uma superfície de 34254 hectares e uma produção de 62552 toneladas. Em relação ao trigo duro, a superfície de cultivo existente em Portugal é significativamente menor quando comparada com a superfície cultivada de trigo mole, registando um valor de apenas 1422 hectares e uma produção de 2678 toneladas [29]. O cultivo de trigo duro verifica-se, essencialmente, nas regiões como o norte de África, a Índia, a Europa Mediterrânea e o Médio Oriente [28].

A produção de trigo em Portugal é consideravelmente menor comparativamente com a produção em países do norte da Europa, como França, Reino Unido e Alemanha [30]. Tal facto verifica-se devido há existência de constrangimentos climáticos que se encontram associados ao clima mediterrânico apresentado por Portugal [31]. Segundo José Coutinho *et al.* [31] (2014), estes constrangimentos “potenciam a notável variabilidade na produção e na qualidade dos cereais de ano para ano.”

As propriedades nutricionais do trigo, em particular o teor proteico e o teor de glúten dependem de diversos factores ambientais, como as propriedades do solo, nomeadamente a sua fertilidade e o seu

pH, a disponibilidade de água e a aplicação de fertilizantes [28, 32].

### 2.4.2 Estrutura do grão

O grão de trigo apresenta, geralmente, uma forma oval, com um comprimento entre 5-9 mm e um peso compreendido entre 35-50 mg [33]. No que diz respeito à estrutura física (figura 2.2 e 2.3), é possível dividir o grão de trigo em três partes essenciais: o embrião (também conhecido como gérmen), o endosperma e o farelo. O embrião, localizado na parte inferior do endosperma, é constituído, essencialmente, por vitaminas, minerais e proteínas. Esta estrutura representa 2-4% da massa total do grão de trigo [34]. O endosperma é a maior estrutura do grão, representando 80-85% da sua massa total. As células desta estrutura têm como função fornecer substâncias de reserva (proteínas, amido e componentes minoritários, lípidos e minerais) destinadas ao desenvolvimento da nova planta aquando da germinação do embrião [35]. Na parte mais exterior do grão é possível encontrar o farelo, ou seja, um conjunto de várias camadas cuja função consiste na proteção do grão. Esta estrutura é constituída maioritariamente por fibra, apresentando nas camadas mais internas componentes como proteínas, minerais e vitaminas [35]. Esta estrutura do grão de trigo representa cerca de 12-18% da sua massa total [28].

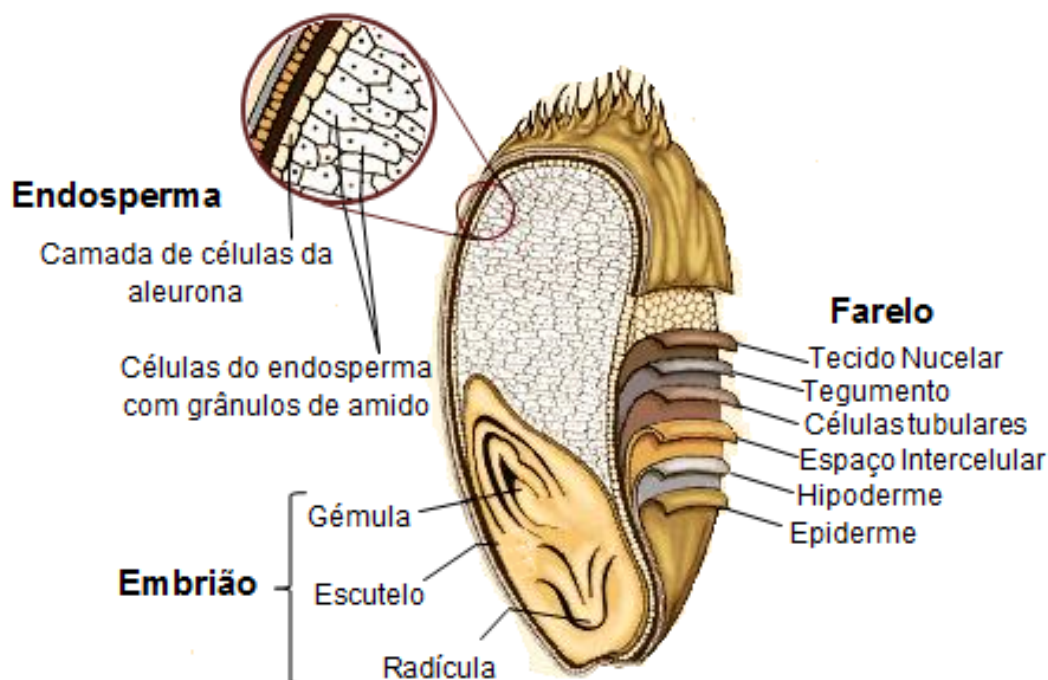


Figura 2.2: Representação das diversas estruturas físicas que constituem um grão de trigo (adaptado da Ref. [36]).

O trigo, tal como muitos outros cereais, é caracterizado pela união entre a parede do fruto (denominada de pericarpo) e a semente, sendo este tipo de fruto designado por cariopse [33]. Esta característica é específica das plantas gramíneas nas quais é possível observar um mecanismo distinto referente à absorção do ferro, denominado por estratégia de quelação, sendo esta considerada como uma adaptação aos solos alcalinos [37], onde o elevado pH é responsável pela menor solubilidade deste elemento [32].

O processo utilizado pela indústria na moagem dos grãos de trigo para a obtenção da farinha (no caso do trigo mole) ou da semolina (no caso do trigo duro) é constituído por quatro etapas principais. A etapa inicial diz respeito à limpeza dos grãos, onde todas as impurezas são eliminadas de forma a não interferirem com a qualidade do produto final. A etapa seguinte refere-se ao condicionamento, cujo objetivo consiste no alcance de um teor ótimo de humidade por parte do grão, de forma a obter a máxima extração de farinha e/ou semolina. As duas etapas finais são a moagem e a classificação. O processo da moagem tem início com a separação do endosperma das restantes estruturas do grão (embrião e pericarpo), estando a fase seguinte associada à sua trituração. O embrião é separado com o objetivo de diminuir o conteúdo lipídico diminuindo, assim, a rancidez do produto final obtido. Por outro lado, a separação das camadas mais externas do grão tem como objetivo melhorar as características como a textura e o sabor e reduzir o conteúdo em fibra permitindo, assim, refeições mais leves. Na última etapa do processo, os grãos de trigo são classificados com base nos parâmetros tecnológicos (índices colorimétricos, teor proteico, rigidez, entre outros) [28].

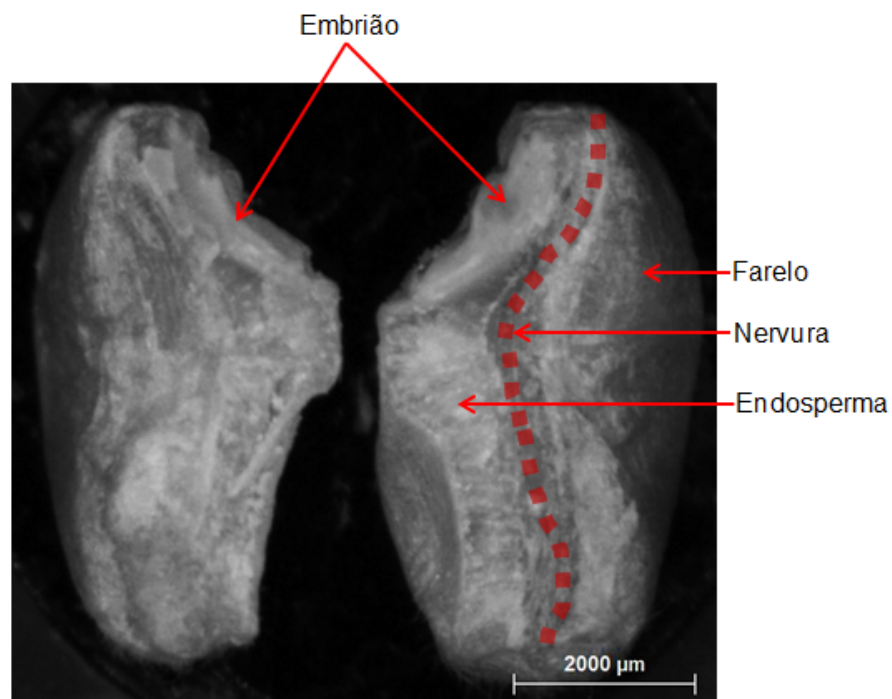


Figura 2.3: Imagem do mapeamento de um grão de trigo obtida através do espectrómetro de  $\mu$ -EDXRF, onde é possível observar as principais estruturas (embrião, endosperma e farelo). A nervura corresponde à junção do farelo de cada uma das partes do grão.



## Capítulo 3

# Técnica Experimental

### 3.1 Produção de Raios-X

Os raios-X foram descobertos pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen no final do século XIX, após ter observado a emissão de radiação penetrante proveniente de tubos de raios catódicos. Dada a natureza desconhecida desta radiação, Röntgen designou-a de raios-X [13]. Posteriormente, verificou-se que os raios-X não são mais do que radiação eletromagnética com um comprimento de onda compreendido entre 0,01nm e 10nm, o que corresponde no espectro eletromagnético ao intervalo entre os raios gama e a radiação ultravioleta [38].

A produção de raios-X pode ocorrer através de três mecanismos distintos: i) desaceleração de partículas carregadas de elevada energia (electrões, prótons, partículas alfa), ii) transições eletrónicas nas camadas internas dos átomos ou iii) processos de decaimento de fontes radioativas [38].

No primeiro mecanismo, a desaceleração das partículas carregadas é acompanhada por uma perda de energia e por uma mudança de direção das mesmas devido à influência do núcleo pesado do alvo, resultando na emissão de radiação denominada de *Bremsstrahlung* ou radiação de travagem, tal como está ilustrado na figura 3.1. Este tipo de radiação constitui a componente contínua de um espectro de emissão de raio-X proveniente de um tubo [39].

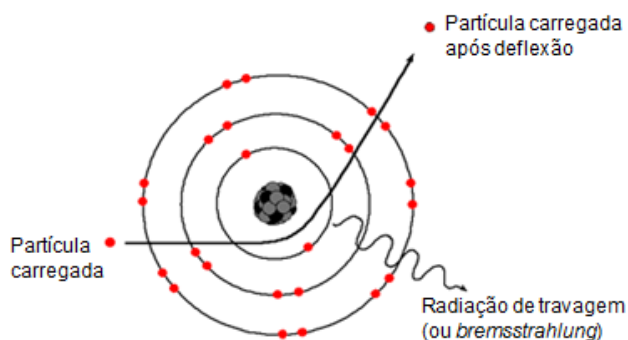


Figura 3.1: Emissão de radiação de travagem (*Bremsstrahlung*) como resultado da desaceleração de uma partícula carregada de elevada energia (adaptado da Ref. [40]).

No segundo mecanismo, como resultado da interação entre um fóton e um elétron "ligado", observa-se a ionização do átomo, passando este a ocupar um estado de maior energia e, consequentemente, mais instável. De forma a recuperar a sua estabilidade, é necessário que a lacuna resultante da ejeção do elétron de uma camada interna seja preenchida por outro elétron proveniente de uma camada mais externa. A transição eletrônica é acompanhada pela emissão de um fóton de raios-X com uma energia bem definida, correspondente à diferença de energias entre as camadas eletrônicas envolvidos (*cf.* figura 3.2) [38]. Este tipo de radiação, denominada de fluorescência, constitui a componente discreta do espectro de emissão de raio-X e é característica do material envolvido na interação [39].

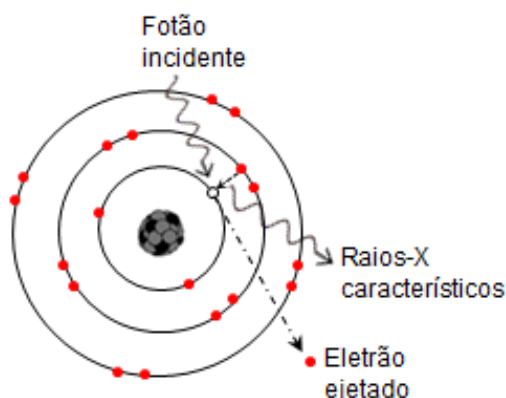


Figura 3.2: Emissão de um fóton de raios-X característico resultante da transição eletrônica (adaptado da Ref. [40]).

O último mecanismo de produção de raios-X está relacionado com o decaimento de uma fonte radioativa. No presente trabalho, apenas os dois primeiros mecanismos de produção de raios-X são analisados.

## 3.2 Processos de Interação dos Raios-X com a Matéria

Uma das dificuldades da Física clássica consistia na explicação do efeito fotoelétrico [41]. Com o objectivo de explicar este processo de interação da radiação com a matéria e com base nos estudos da radiação de um corpo negro [42], realizados por Max Planck em 1900, Einstein assumiu uma concepção corpuscular da luz [41], sendo esta composta por *quanta*, os fótons, partículas sem massa nem carga elétrica e com energias ( $E$ ) que se relacionam com a frequência ( $\nu$ ) através da expressão:

$$E = h\nu \quad (3.1)$$

onde  $h = 6,626 \times 10^{-34}$  J.s é a constante de Planck.

A interação do feixe de fótons com os elétrons existentes no meio conduz a uma atenuação da intensidade do feixe incidente. Esta atenuação resulta, essencialmente, da existência de processos como o efeito fotoelétrico e os fenómenos de dispersão (elástica e inelástica) [43]. A relação entre a intensidade inicial e final do feixe pode ser descrita pela lei de Lambert-Beer:

$$I_x = I_0 \times e^{-\mu \rho x} \quad (3.2)$$



onde  $I_x$  é a intensidade do feixe depois de atravessar um material de espessura  $x$ ,  $I_0$  é a intensidade do feixe inicial incidente na amostra,  $\mu$  é o coeficiente linear de atenuação e  $\rho$  é a densidade do material atenuador.

### 3.2.1 Efeito Fotoelétrico

O efeito fotoelétrico é o processo físico no qual um dos elétrons presente numa camada do átomo (também denominado de fotoelétrão) é ejetado devido à transferência de energia de um fóton para o elétron "ligado" do átomo [13]. A energia do fóton incidente terá de ser superior à energia de ligação do elétron ( $W_0$ ), de forma a que se verifique a ionização dos átomos da amostra. Quando esta condição é satisfeita o elétron é libertado do átomo com energia cinética dada por:

$$E_c = h\nu - W_0 \quad (3.3)$$

Verifica-se, assim, a existência de um limiar na energia e não na intensidade, como afirmava o eletromagnetismo clássico [41].

Depois de ionizado, o sistema pode voltar para um estado de menor energia através da transferência de um elétron, de uma das camadas exteriores, para a lacuna criada anteriormente numa camada interior. Esta transferência é acompanhada da emissão de radiação eletromagnética com energia equivalente à diferença de energias das camadas eletrónicas envolvidas no processo, tratando-se, assim, de uma transição radiativa. Alternativamente, pode ocorrer um rearranjo do cortejo eletrónico, sem emissão de radiação eletromagnética mas com a ejeção de outro elétron do mesmo átomo, denominado elétron de Auger. Neste caso temos uma transição não radiativa (ou de Auger) [13].

Em termos de probabilidades, as transições radiativas são mais prováveis para elementos com  $Z$  maior, ao passo que as transições não radiativas ocorrem, predominantemente, em elementos leves (com  $Z < 40$ ), tal como se pode observar através da figura 3.3 [38].

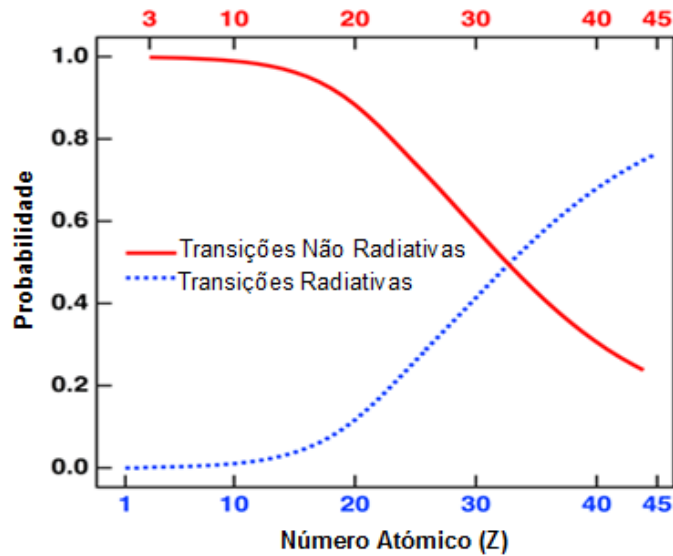


Figura 3.3: Probabilidade das transições radiativas (azul) e não radiativas (vermelho) em função do número atômico (adaptado da Ref. [44]).

### 3.2.2 Fenómenos de Dispersão

A natureza da interação de um fóton com um eletrão permite-nos distinguir dois tipos de dispersão: a dispersão de Compton, também conhecida como dispersão inelástica (figura 3.4) e a dispersão de Rayleigh ou dispersão elástica [38]. Na dispersão de Compton, um fóton interage com um eletrão cuja energia de ligação é relativamente pequena quando comparada com a energia do fóton incidente provocando, não só a deflexão, como também, a "perda" de energia do fóton incidente uma vez que parte da energia inicial é transferida para o eletrão [41]. Após a interação, o eletrão adquire uma energia que corresponde à diferença entre a energia do fóton incidente e defletido, à qual é ainda subtraída a sua energia de ligação.

Tal como é descrito na equação 3.4, a energia do fóton defletido ( $h\nu'$ ) depende da energia do fóton incidente ( $h\nu$ ) e do ângulo de deflexão ( $\theta$ ) [13].

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \frac{h\nu}{m_0c^2(1 - \cos\theta)}} \quad (3.4)$$

O termo  $m_0c^2$  corresponde à energia do eletrão em repouso.

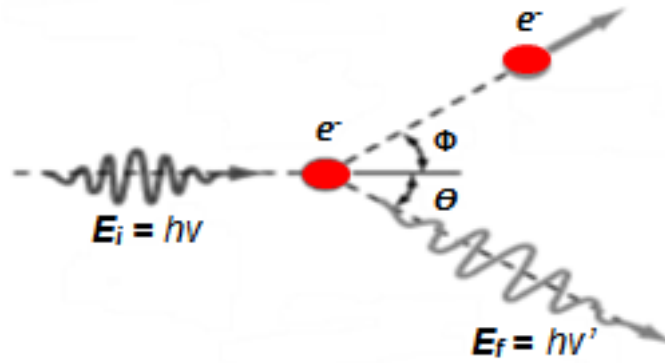


Figura 3.4: Ilustração da dispersão de Compton (inelástica) onde um fóton com energia inicial,  $E_i$ , interage com um eletrão. Desta interação resulta um fóton com energia  $E_f$  ( $E_f < E_i$ ) e um eletrão com energia dada por  $\Delta E = (E_i - E_f) - W_0$  (adaptado da Ref. [45]).

Ao contrário da dispersão descrita anteriormente, a dispersão de Rayleigh resulta da interação de um fóton com um eletrão "fortemente ligado" do átomo, sem variação de energia, ou seja, a radiação absorvida pelo eletrão é re-emitida com a mesma energia da radiação incidente [13], permanecendo o átomo no seu estado fundamental [38]. A dispersão de Rayleigh verifica-se, maioritariamente, para baixas energias e elevado número atómico ( $Z$ ), sendo a probabilidade de ocorrência deste processo proporcional a  $Z^2$ , ao passo que a probabilidade da dispersão de Compton depende apenas de  $Z$  e, contrariamente à dispersão anterior, é favorecida para fótons de elevada energia [38].

Com base na radiação característica dispersa, os fenómenos de dispersão não permitem a caracterização elemental das amostras sendo, no entanto, responsáveis por aumentar a radiação de fundo do detetor [38].

### 3.3 Espectroscopia de Raios-X

A produção de um espectro de emissão de raios-X, tal como o apresentado na secção 3.3.2, requer uma fonte de excitação. Na espectroscopia de raios-X, esta pode ser proveniente de fontes radioativas, tubos de raios-X ou aceleradores de partículas denominados sincrotrões [38].

#### 3.3.1 Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X

A espectroscopia de fluorescência de raios-X é uma técnica de análise multielementar a partir da qual é possível obter informação qualitativa e quantitativa dos elementos (com  $Z > 11$ ) presentes na amostra em estudo [38].

As maiores vantagens desta técnica comparativamente aos métodos químicos (do inglês, “*wet chemistry*”) estão relacionadas com o facto das análises serem simples, não destrutivas, independentes da estrutura química da amostra, não utilizarem químicos nocivos e as amostras em análise podem apresentar diversas formas, assim como, diferentes estados físicos (sólidas, líquidas ou gasosas). A simplicidade dos espectros obtidos é outra das vantagens que torna esta técnica preferível aos restantes métodos de análise [46].

O princípio físico por detrás da técnica de espectroscopia de fluorescência de raios-X está relacionado com o facto de todos os elementos presentes na amostra emitirem radiação X (“fluorescência”), com uma energia característica, quando expostos a radiação eletromagnética de elevada energia. A emissão dos fótons de raios-X resulta da ionização das camadas internas dos átomos presentes na amostra, sendo esta ionização consequência da absorção fotoelétrica, tal como descrito na secção 3.1.

A energia característica da radiação X pode ser analisada através de dois métodos espectroscópicos. Por um lado temos o método de Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia (EDXRF), onde a separação das energias é realizada por um detetor de estado sólido, por outro lado, temos o método de Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Comprimento de Onda (WDXRF - *Wavelength Dispersive X-Ray Fluorescence*), onde a separação das energias é realizada por um cristal (lei de Bragg) [46]. O sistema usado neste trabalho é um espectralómetro de raios-X dispersivo em energia e, como tal, apenas o primeiro método será descrito em detalhe.

Após a ionização de uma camada interna, a probabilidade do preenchimento da lacuna presente numa das camadas eletrónicas ( $i = K, L, M, \dots$ ) resultar na emissão de um fóton de raios-X, ou seja, numa transição radiativa é designada por rendimento de fluorescência ( $\omega_i$ ) e é definida por

$$\omega_i = \frac{P_R}{P_R + P_{NR}}, \quad (3.5)$$

onde  $P_R$  corresponde à probabilidade da transição radiativa e  $P_{NR}$  corresponde à probabilidade da transição não radiativa.

Este rendimento depende não só do número atómico ( $Z$ ), mas também da camada onde se encontra a lacuna [47]. Através da figura 3.5 é possível observar que o rendimento de fluorescência é menor para os elementos com menor  $Z$ , o que explica o facto das técnicas de espectroscopia de raios-X serem menos sensíveis para elementos mais leves.

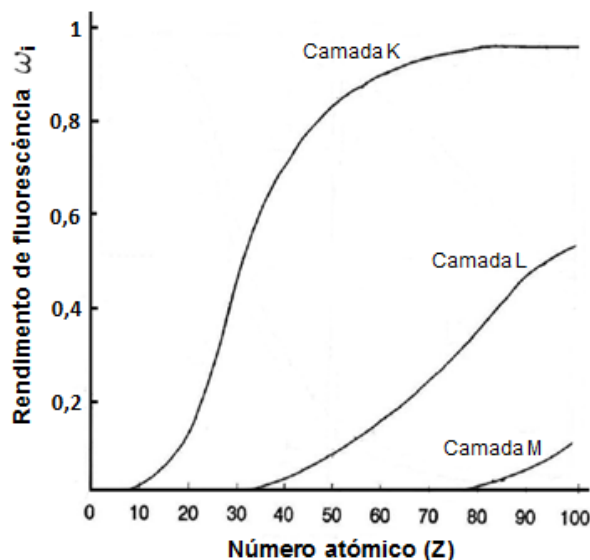


Figura 3.5: Representação do rendimento de fluorescência ( $\omega_i$ ) em função do número atômico ( $Z$ ) e das camadas eletrônicas ( $i = K, L, M$ ). Tal como se pode verificar, o rendimento de fluorescência aumenta com o número atômico e diminui à medida que as camadas eletrônicas se afastam do núcleo do átomo (adaptado da Ref. [43]).

### Micro Espetroscopia de Fluorescência de Raios-X

A espectroscopia convencional de fluorescência de raios-X permite, apenas, a análise de amostras homogêneas com uma área relativamente grande (20 a 60 mm), contrariamente ao que se verifica na micro espectroscopia de fluorescência de raios-X ( $\mu$ -XRF), que permite não só a análise de amostras com uma área mais pequena (na ordem dos 0,025 a 0,100 mm), como também amostras não homogêneas e irregulares [47].

Uma das grandes vantagens da técnica de  $\mu$ -XRF está relacionada com a existência de uma lente de focagem policapilar que, devido a múltiplas reflexões totais, faz com que o feixe de raios-X seja focado num ponto da amostra com 25  $\mu$ m de diâmetro. Desta forma, o reduzido tamanho do ponto de focagem faz com que a intensidade detetada seja maior para a mesma potência do tubo de raios-X. Outra vantagem associada a esta técnica é a possibilidade das análises serem realizadas em ar ou em vácuo. No caso do vácuo, a absorção da radiação característica dos elementos pelo ar é evitada permitindo, assim, a deteção de elementos leves. Tipicamente, o elemento mais leve que pode ser analisado é o magnésio (Mg) [47].

Apesar das vantagens enunciadas anteriormente, verifica-se que a sensibilidade e os limites de deteção da técnica de  $\mu$ -XRF são inferiores comparativamente à técnica de EDXRF com geometria triaxial, nos intervalos cuja energia é muito baixa ou elevada [47].

### Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia

No caso da fluorescência de raios-X dispersiva em energia, a radiação fluorescente é detetada por um detetor dispersivo em energia do tipo SDD (do inglês, *Silicon Drift Detector*). Depois de

detetada, o detetor em conjunto com um analisador multicanal, procedem à separação das diferentes energias da radiação característica [48].

Este tipo de detetor (dispersivo em energia) é, assim, capaz de transformar a energia absorvida da radiação fluorescente num sinal elétrico proporcional à energia do fóton de raios-X detetado. Este sinal é, posteriormente, processado (pré-amplificado e filtrado) e apresentado num espectro que relaciona a intensidade dos picos com a energia [47].

A resolução é uma das características mais importantes num detetor dado que uma elevada resolução permite ao espectrómetro separar dois picos de energias muito próximas. Esta grandeza é determinada através da largura a meia altura do pico (FWHM - *Full Width at Half Maximum*). Geralmente, a medição é efetuada nas linhas  $K_{\alpha}$  do ferro (Fe) ou do Manganês (Mn) [13].

As principais vantagens dos sistemas de EDXRF são a simplicidade, a rapidez de operação e a elevada eficiência [48].

Para além do sistema de deteção da radiação característica descrito anteriormente, o espectrómetro de  $\mu$ -XRF utilizado neste trabalho é, também, composto por um sistema de excitação. Estes dois sistemas podem ser observados na figura 3.6.

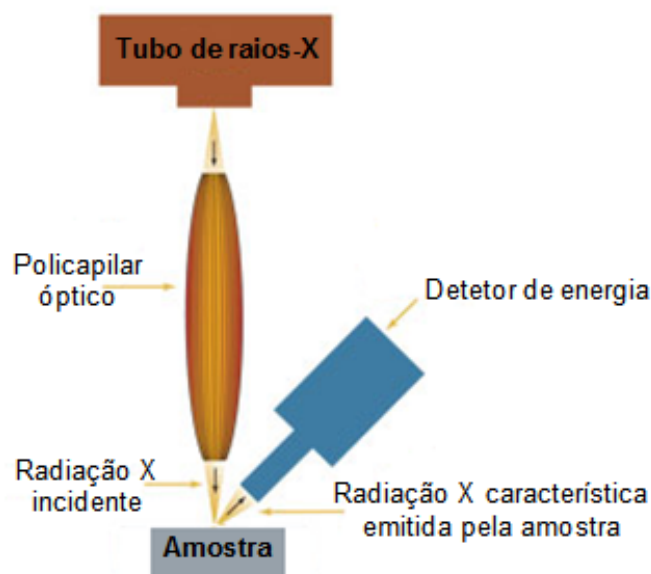


Figura 3.6: Ilustração de um espectrómetro de XRF composto pelo sistema de excitação, do qual fazem parte o tubo de raios-X e o policapilar óptico, pela amostra em estudo e pelo sistema de deteção, sendo este constituído por um detetor dispersivo em energia (adaptado da Ref. [48]).

O sistema de excitação em questão consiste num tubo de raios-X, onde os eletrões são emitidos por um cátodo, o qual consiste num filamento de tungsténio, aquecido pela circulação da corrente elétrica, posteriormente, são acelerados devido à diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo e, finalmente, são focados num alvo metálico, denominado ânodo. Os eletrões atingem o alvo com energia cinética correspondente à diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo [38]. Os raios-X resultantes desta colisão atravessam a "janela" de berílio (Be) ou de vidro, sendo o feixe de raios-X, posteriormente, colimado através de um policapilar, de forma a limitar a divergência dos raios-X que incidem sobre a amostra [13].

O espectro resultante do tubo de raios-X é constituído por duas componentes; a componente contínua associada à radiação de travagem dos eletrões no ânodo (também conhecida como *Bremsstrahlung*) e a componente discreta que resulta da ionização direta do material metálico do ânodo. Estas duas componentes podem ser observadas na figura 3.7.

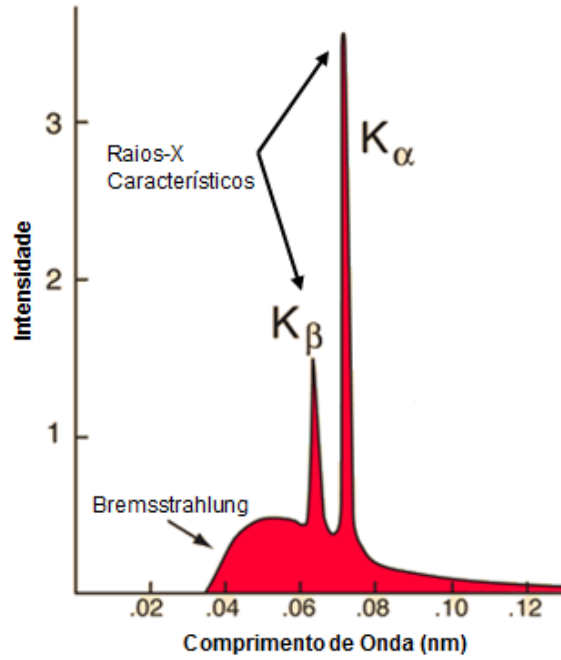


Figura 3.7: Espectro de emissão de raios-X do molibdénio excitado por eletrões de 35 KeV. No espectro é possível observar a componente contínua associada à radiação de travagem (ou *Bremsstrahlung*), assim como, a componente discreta que se encontra representada através das linhas características mais energéticas (adaptado da Ref. [45]).

A componente discreta do espectro observa-se, apenas, quando a tensão aplicada é superior à tensão crítica ( $V_c$ , correspondente à energia de ligação dos eletrões dos átomos que compõem o ânodo). A intensidade das linhas características ( $I'$ ) é proporcional à corrente que passa através do tubo de raios-X ( $i'$ ) e é uma função não linear da tensão aplicada no tubo ( $V$ ), tal como é descrito pela seguinte função [38]

$$I' = C \times i' \times (V - V_c)^\gamma, \quad (3.6)$$

onde  $\gamma$  é uma constante que depende da linha emitida ( $1,5 \leq \gamma \leq 2$ ) e  $C$  é uma constante que se encontra relacionada com o material constituinte do ânodo e depende de várias grandezas como o rendimento de fluorescência.

Em relação à componente contínua do espectro, verifica-se que esta varia entre zero e a energia cinética máxima dos eletrões que atingem o alvo. Desta forma, é possível concluir que o limite máximo da distribuição da radiação de travagem depende apenas da energia com que os eletrões são acelerados. A intensidade total do espectro contínuo ( $I''$ ) aumenta, não só, com o número atómico ( $Z$ ) do material que constitui o ânodo, como também, com a tensão aplicada no tubo de raios-X, tal como é descrito na seguinte função [38]

$$I'' = k \times Z \times V^2, \quad (3.7)$$

onde  $k$  é uma constante que depende da corrente do tubo de raios-X.

### 3.3.2 Análise Qualitativa e Quantitativa

Com base na informação contida no espectro obtido através da técnica de  $\mu$ -EDXRF, é possível realizar uma análise qualitativa e quantitativa da amostra em estudo.

#### Avaliação Espectral

Antes de proceder à avaliação do espectro de raios-X é necessário perceber todos os fenómenos que determinam o espectro. Um desses fenómenos está relacionado com a existência de diversos artefactos, causados pelo funcionamento do detetor [43]. Os artefactos que ocorrem mais frequentemente são os picos soma, os picos escape, a recolha incompleta de carga, a dispersão de Compton e de Rayleigh e os picos de difração, sendo que este último artefacto, ao contrário dos referidos anteriormente, não está relacionado com o detetor mas sim com a amostra em estudo. Estes artefactos são responsáveis não só pela degradação do sinal proveniente do detetor, como também, pelo aumento do nível de fundo do espectro [38].

Os picos soma resultam da detecção paralela de dois fótons de raios-X num intervalo de tempo extremamente pequeno. Desta forma, o pico resultante corresponde à soma da energia dos dois fótons detetados quase simultaneamente [47].

Os picos escape ocorrem quando um fóton de raios-X característico do material que é composto o cristal do detetor (1,74 KeV para o Si), proveniente de uma das camadas internas do Silício (Si), escapa do detetor, conduzindo, assim, a uma recolha de carga que não corresponde à energia total do fóton incidente mas sim a um defeito de 1,74 KeV, aparecendo assim um pico desviado no espectro [38].

O pico de difração ocorre quando a radiação proveniente do tubo de raios-X é refletida pela estrutura cristalina da amostra (reflexão de Bragg). O cristal presente na amostra determina a energia da radiação dispersa em direção ao detetor, segundo um determinado ângulo, provocando, desta forma, o aparecimento de picos adicionais no espectro de materiais cristalinos [47].

Na dispersão de Rayleigh (dispersão elástica) verifica-se o aparecimento de um pico na posição correspondente à linha de fluorescência do ródio (Rh) devido ao facto de este ser o material constituinte do alvo do tubo de raios-X utilizado neste trabalho. No caso da dispersão de Compton (dispersão inelástica), o fóton disperso perde alguma energia conduzindo, assim, ao aparecimento de um pico menos energético, comparativamente ao pico obtido na dispersão de Rayleigh. Quanto mais leve for a amostra, maior é a probabilidade da dispersão de Compton ocorrer, enquanto que para materiais mais pesados o pico de Compton é praticamente invisível, ao passo que o pico de Rayleigh torna-se cada vez mais visível [47].

Na figura 3.8 encontra-se o espectro de uma amostra biológica, obtido através do espectrómetro de  $\mu$ -EDXRF utilizado neste trabalho. Tal como se encontra representado, este tipo de espectro pode ser dividido em três regiões.

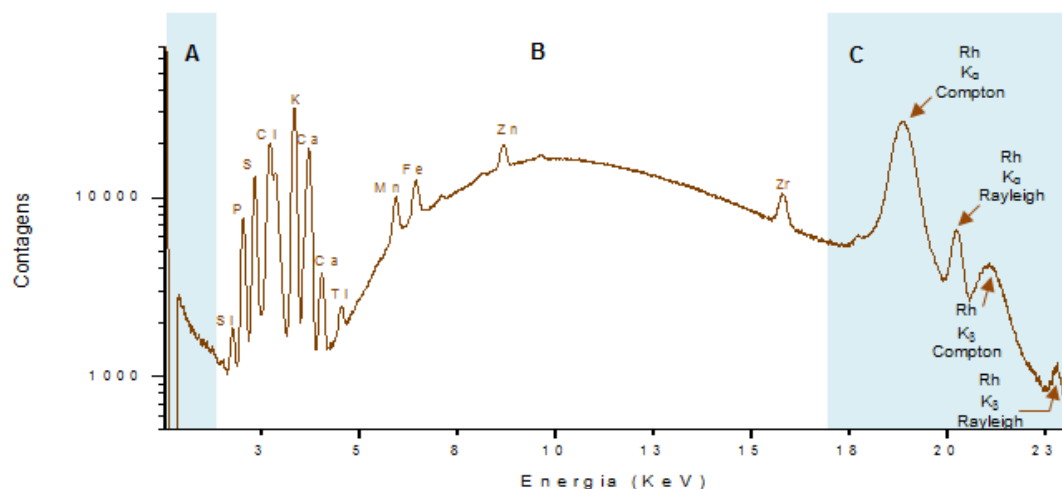


Figura 3.8: Espectro de um grão de trigo fortificado com 90 mL de uma solução nutritiva, obtido com o espectrómetro de  $\mu$ -EDXRF. As regiões A, B e C correspondem às três zonas existentes num espectro desta natureza.

Na região C (região de elevada energia) encontram-se presentes os picos de dispersão elástica e inelástica das radiações  $K\alpha$  e  $K\beta$  do ródio (Rh). A maior intensidade do pico de dispersão inelástica (Compton), em comparação com o pico de dispersão elástica (Rayleigh), deve-se ao facto da amostra em estudo ser constituída, maioritariamente, por elementos leves, tais como carbono (C), hidrogénio (H) e oxigénio (O) [38].

A região A (região de menor energia) caracteriza-se, essencialmente, pelo ruído do sistema, visto que a eficiência do detetor é extremamente baixa nesta região [38].

A região B (região de energia intermédia) é composta não só pelas riscas características  $K$  e  $L$ , como também, pela radiação de fundo. Esta é considerada a região de interesse uma vez que através das riscas características é possível a identificação dos elementos presentes na amostra, ou seja, é possível uma análise qualitativa do espectro [38]. A presença do pico de zircónio (Zr) nesta região do espectro deve-se ao facto de este ser um elemento constituinte dos colimadores internos do detetor de  $\mu$ -EDXRF.

A radiação de fundo no espectro de XRF é devida à dispersão da radiação do tubo de raios-X na amostra, em direção ao detetor. A intensidade da dispersão depende da natureza da própria amostra, ou seja, para matrizes leves a dispersão é mais intensa do que para matrizes pesadas. A distribuição espectral da radiação de fundo é determinada pela distribuição da radiação de travagem do tubo [47].

Na avaliação espectral, os picos são identificados com base nas energias das riscas características (das camadas  $K$  e  $L$ ), próprias de cada elemento.

### Processo de Quantificação

As análises quantitativas são realizadas com o objetivo de obter informação acerca da quantidade relativa dos elementos presentes na amostra, em termos da sua concentração, normalmente expressas em percentagem de massa ou  $\mu g/g$  [38].



Existem diversos métodos que permitem a quantificação elementar das amostras. No entanto, quando o objetivo da quantificação consiste na determinação de diversos elementos, numa matriz desconhecida e constante, ou numa amostra com efeitos de matriz pouco significativos, o método comparativo é o escolhido para proceder à quantificação [38].

O primeiro passo da análise quantitativa de fluorescência de raios-X consiste na deconvolução dos dados espectrais, de forma a determinar a intensidade de cada um dos picos de raios-X característicos [38]. Posteriormente, recorrendo ao método comparativo, é possível estabelecer uma correlação direta entre a intensidade dos picos de raios-X característicos e as concentrações elementares presentes na amostra. O método comparativo determina, assim, a sensibilidade de cada um dos elementos por comparação com os materiais de referência (SRM - *Standard Reference Materials*) conhecidos, também, como padrões de calibração [43].

A principal desvantagem associada a este método comparativo está relacionada com a seleção dos padrões de calibração, dado que estes têm de refletir a matriz e a composição elementar das amostras em estudo [43].

Neste trabalho, optou-se pela medição de cinco áreas em cada um dos materiais de referência, de forma a cobrir toda a sua superfície. A escolha das áreas, em alternativa à análise pontual, revelou-se um método mais eficaz para as quantificações dos materiais de referência, as quais dão origem ao ficheiro de calibração, ou seja, ficheiro que serve de base ao programa de quantificação WinFund. Desta forma, verifica-se uma melhoria significativa dos resultados quantitativos de todos os elementos estudados, com particular destaque para o ferro (Fe), devido à formação de aglomerados causados pelas interações hidrofóbicas entre as nanopartículas de óxidos de ferro [49], que através da análise pontual não eram, frequentemente, identificáveis.



## Capítulo 4

# Procedimento Experimental

### 4.1 Material Biológico

Neste trabalho utilizaram-se duas espécies distintas de grãos de trigo, *Triticum durum* Desf. (trigo duro) e *Triticum aestivum* L. (trigo mole). As espécies diferem entre si, tal como o próprio nome indica, pela dureza do grão, estando esta característica associada ao conteúdo proteico de cada uma dessas espécies. O trigo duro caracteriza-se por uma maior dureza e, com tal, o seu conteúdo proteico é superior comparativamente ao do trigo mole [27].

Na espécie *Triticum durum* Desf., optou-se pela variedade Marialva, inscrita no Catálogo Nacional de Variedades, devido à sua elevada produtividade e adaptabilidade ao clima português. Por outro lado, no que diz respeito à espécie *Triticum aestivum* L., optou-se pela variedade Roxo, também inscrita no Catálogo Nacional de Variedades, por se tratar de uma das principais variedades cultivadas pelos agricultores portugueses, com uma boa qualidade tecnológica e pouco susceptível a doenças.

Os grãos de ambas as espécies resultaram de um processo de crescimento em condições ambientais controladas, sendo este processo realizado por colaboradores, no DCT da FCT-UNL.

### 4.2 Implementação das Culturas de Trigo

Numa primeira fase, as sementes certificadas de *Triticum durum* Desf. cv. Marialva, assim como, as sementes certificadas de *Triticum aestivum* L. cv. Roxo foram semeadas em 22 vasos. O substrato presente em cada um dos vasos apresentava as seguintes características: pH 5,5 - 6,5 (intervalo onde a disponibilidade dos nutrientes no solo é maior); condutividade 0,6 - 1,2mS cm<sup>-1</sup>; 70% de matéria orgânica; 4,618% Ca; 0,975% K; 0,425% P; 0,572% Mg; 13,28 ppm Cu; 40,33 ppm Zn e 0,181% Fe.

Depois de semeadas, as sementes foram colocadas numa câmara de crescimento Walk-in – Aralab (10.000 EHF; N° série: 1084; Portugal) onde, através do controlo dos fatores ambientes como a temperatura, a luz, a humidade, a pressão e o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), foi possível a germinação e o crescimento das sementes. Através do sistema “ClimaPlus V” foram estabelecidos os valores

para os diversos fatores ambientais e criados ciclos de dia - noite, ciclos temporários ou permanentes. Para este trabalho as condições ambientais utilizadas foram as seguintes: humidade relativa 80%; 500 ppm de CO<sub>2</sub>; temperatura 22/18°C dia/noite; fotoperíodo 12/12 h dia/noite e densidade de fluxo fotossintético 800  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

No 16º dia após a germinação, das 6 sementes de *Triticum durum* Desf. cv. Marialva semeadas em cada um dos 22 vasos, selecionaram-se apenas 4 plantas, as quais foram, posteriormente, submetidas a diferentes tratamentos de adubação. Estes tratamentos consistiam na aplicação de diferentes quantidades (15 mL, 30 mL, 60 mL e 90 mL) de uma solução nutritiva completa, dissolvida em 5 L de água destilada. A solução nutritiva completa utilizada neste caso resultou da mistura de duas soluções (A e B) num balão volumétrico, completando-se o volume de 1000 mL com água destilada. A solução A foi preparada com 0,09 g de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (Merck 1173874); 0,12 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>MO<sub>7</sub>O<sub>2</sub>4.4H<sub>2</sub>O (Merck 1182); 0,01 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Merck 10043353); 0,016 g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Merck 7446200); 0,08 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Merck 7758987); 0,16 g de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich 44943) e 12,00 g de C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O (Merck 902). Posteriormente, esta solução foi homogeneizada com 50 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95-97% (Merck 7664939), sob agitação numa placa (RS Lab 11 NCD, França). No que diz respeito à solução B, esta foi preparada em 700 mL de água destilada, sob agitação numa placa RS Lab 11 NCD, contendo 111 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (Merck 6484522); 30 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Panreac 122507); 65 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Scharlau PO02871000); 17 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (Scharlau CA01941000) e 4,8 g de MgSO<sub>4</sub> (Merck 7487889).

No decurso do ciclo de vida das plantas e em diferentes períodos experimentais (16, 70, 92 e 126 dias) após a germinação, procedeu-se à recolha de 4 plantas para análises subseqüentes. O período de recolha das plantas coincide com períodos chave no seu desenvolvimento (afilhamento, emborrachamento, espigamento e maturação fisiológica, respetivamente).

Em relação às sementes de *Triticum aestivum* L. cv. Roxo, o procedimento adotado foi bastante semelhante, contudo com algumas diferenças no que diz respeito ao número de sementes semeadas em cada vaso (8 sementes em vez de 6, como anteriormente), estando estas a uma profundidade de 5 cm. As sementes foram regadas de 2 em 2 dias até ao aparecimento da primeira folha passando, depois, a regar-se diariamente. Tal como referido anteriormente, as 4 plantas selecionadas por vaso, ao 16º dia após a germinação, foram submetidas aos seguintes tratamentos de adubação: 3 mL/L de uma solução nutritiva completa, em plantas provenientes de sementes controlo (F0 0,3/0,3) e 15 mL/L da mesma solução nutritiva completa, em plantas provenientes da 4ª progenitura (F4 1,5/1,5), respetivamente.

Tal como realizado anteriormente, também para esta espécie se procedeu à recolha de 4 plantas em diferentes períodos experimentais (31, 84, 107 e 141 dias) após a germinação. Também neste caso, os períodos de recolha estão relacionados com etapas chave no desenvolvimento das plantas em estudo (afilhamento, emborrachamento, espigamento e maturação fisiológica, respetivamente).

A solução nutritiva completa utilizada no tratamento de adubação de ambas as espécies de sementes tinha a mesma composição química e o procedimento de preparação da solução foi o mesmo em ambos os casos.

### 4.3 Preparação das Amostras para Análise por $\mu$ - EDXRF

De forma a determinar a concentração elementar em cada uma das estruturas do grão de trigo, começou-se por cortar o grão ao meio, no sentido vertical, com a ajuda de uma lâmina cirúrgica de aço inoxidável. Posteriormente, cada uma das partes do grão foi colocada, com as estruturas orientadas na direção do feixe de raios-X, sobre fita de carbono, presente na parte posterior das caixas de petri procedendo, desta forma, à análise por  $\mu$  - EDXRF. Por vezes, foi necessário limar um pouco a parte exterior do grão, recorrendo a uma lima de cartão, uma vez que a sua forma oval dificultava o posicionamento da amostra no espectrómetro.

### 4.4 Preparação das Amostras para Análise por Espectrofotometria de Absorção Atômica

As amostras referentes à raiz, parte aérea e grão foram secas em estufa durante 2 horas e a uma temperatura de 105°C. Posteriormente, procedeu-se à pesagem das mesmas, seguida de digestão com a adição de 12 mL de ácido nítrico utilizando-se, para tal, um sistema de Absorção Atômica Unicam (modelo 939, Portugal). A digestão iniciou-se a uma temperatura de 100°C, durante 1 hora, aumentando gradualmente até atingir os 150°C, de forma a obter a destruição total do material orgânico presente na amostra. De seguida, procedeu-se à adição de 2 mL de ácido perclórico, a uma temperatura de 200°C, até o composto digerido se tornar incolor [50].

Na fase seguinte, após arrefecimento, adicionou-se 10 mL de água, colocando-se as amostras a uma temperatura de 100°C durante cerca de 5 minutos, até ao aparecimento de fumos brancos (indicador da libertação de todo o ácido perclórico). Por fim, o extrato resultante da digestão foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL, efetuando-se de seguida a determinação da concentração de cada elemento presente na amostra através da leitura no espectrofotómetro Thermo Scientific (modelo IRIS Interpid II XSP Radial, Estados Unidos da América).

#### 4.4.1 Determinação do Peso Seco

De forma a obter o índice de acumulação total média de macro e micronutrientes, em diferentes partes da planta, procedeu-se à determinação do peso seco ao longo do seu ciclo de crescimento. Após a recolha, as amostras foram lavadas com água destilada e secas com papel de filtro (Whatman n°4) procedendo-se, de seguida, à determinação do peso fresco, com o auxílio de uma balança digital METTLER (Portugal). Posteriormente, as amostras foram colocadas numa estufa a uma temperatura de 50°C, entre 5 a 7 dias, até à obtenção de um peso constante, o que significa que a amostra perdeu todo o seu teor em água. No final do período de secagem, as amostras foram retiradas da estufa e, após um arrefecimento rápido, estas foram novamente pesadas.

A determinação do peso seco foi realizada durante quatro períodos diferentes (os quais correspondem aos períodos de recolha das plantas), de acordo com o procedimento descrito anteriormente. A preparação das amostras, assim como o cálculo do peso seco, foram procedimentos efetuados pelos colaboradores do DCT.

## 4.5 Espectrómetro de $\mu$ - EDXRF

Neste trabalho, as análises qualitativas e quantitativas foram realizadas usando o sistema de  $\mu$  - EDXRF (M4 Tornado<sup>TM</sup>, Bruker, Alemanha). Este espectrómetro é constituído por um tubo de raios-X, o qual é alimentado por um gerador HV de baixa potência, e por um policapilar que faz com que o feixe de raios-X seja focado na amostra com um diâmetro de feixe de 25  $\mu\text{m}$  e, portanto, com uma elevada intensidade de radiação de excitação. A detecção da radiação fluorescente é realizada por um detetor dispersivo em energia SDD, XFlash<sup>TM</sup>, com uma área sensível de 30  $\text{mm}^2$  e uma resolução de energia de 142 eV para as riscas  $K_\alpha$  do manganês (Mn) [47]. Apenas os elementos com  $Z > 11$  são detetados neste espectrómetro, devido à absorção da radiação pela janela de berílio (Be) do detetor.

As análises elementares dos grãos de trigo foram realizadas com uma tensão de 50 kV e uma corrente de 100  $\mu\text{A}$ , sem a utilização de filtros, de forma a intensificar a ionização dos elementos com baixo Z. Estas análises ocorreram em vácuo, sob uma pressão de 20 mbar, de modo a diminuir a atenuação dos raios-X de baixa energia, aumentando assim a sensibilidade para os elementos leves e em dois modos de funcionamento, o modo de mapeamento do grão e o modo de análise pontual das regiões de interesse. O tempo de aquisição de cada um dos pontos foi de 200 segundos.

## 4.6 Incertezas Associadas à Técnica de $\mu$ - EDXRF

As análises quantitativas realizadas com base na técnica de  $\mu$ -EDXRF encontram-se acompanhadas por dois tipos de incertezas, as incertezas estatísticas e as incertezas sistemáticas. As incertezas estatísticas referem-se a variações aleatórias nas medições efetuadas, o que faz com que estas se encontrem dispersas em torno do valor verdadeiro da grandeza (neste caso, da concentração elementar). Neste trabalho, as incertezas estatísticas associadas à média ponderada são calculadas através da seguinte expressão:

$$\mu(\bar{X}_p) = \frac{1}{\sum_{i=1}^N \mu(X_i)} \sqrt{\sum_{i=1}^N \mu(X_i)^4} \quad (4.1)$$

onde  $\bar{X}_p$  é a média ponderada pela incerteza de medição de cada ponto individual,  $\mu(X_i)$  para cada elemento e  $N$  é o número de medições efetuadas.

Por outro lado, existem as incertezas sistemáticas, ou seja, as incertezas decorrentes do funcionamento do equipamento e que se encontram, também, associadas à própria amostra em estudo. Este tipo de incertezas faz com que no caso dos elementos como o Fe, Zn e Ti exista uma distorção dos resultados sempre no mesmo sentido, ou seja, de minorar o valor da concentração elementar calculada em comparação com o valor real, devido à formação de agregados. No entanto, existem outros erros sistemáticos, como o facto de não serem contabilizados na quantificação as contagens dos picos escape que faz com que, por exemplo, o Ca seja subestimado mas o P (em amostras que também contenha Ca) seja sobrestimado.

As incertezas sistemáticas presentes neste trabalho podem ser causadas por flutuações na intensidade do feixe de raios-X, pela existência de picos escape e picos soma, por variações na espessura da amostra e pela não homogeneidade da concentração elementar. O facto do escutelo e das camadas

que constituem o farelo apresentarem uma largura muito reduzida faz, também, com que os valores obtidos para estas estruturas do grão tenham uma incerteza associada relativamente elevada pois é, tecnicamente, muito complicado fazer incidir o feixe apenas em células deste tipo. Outra das incertezas sistemáticas que se encontra, frequentemente, associada à técnica de  $\mu$ -EDXRF diz respeito às interferências ou efeitos de matriz. Este tipo de interferência resulta da influência de determinados elementos presentes na matriz, como é o caso do ferro, cuja ionização provoca um aumento do sinal dos elementos mais leves.

Neste trabalho, as incertezas associadas às concentrações de cada elemento são devidas, essencialmente, a incertezas sistemáticas, o que significa que a variabilidade dos valores obtidos para um conjunto de medições realizadas sobre a mesma estrutura do grão e para o mesmo elemento, é bastante elevada quando comparada com medições realizadas em amostras planas e homogêneas, como é o caso das amostras padrão.

A incerteza final associada à média ponderada é dada pela raiz quadrada da soma quadrática entre a incerteza estatística da média ponderada ( $\mu(\bar{X}_p)$ ) e o desvio padrão ( $\sigma$ ) das medições efetuadas sobre as mesmas estruturas do grão, tal como se encontra representado na equação 4.2.

$$\mu(\bar{X}_p)_{final} = \sqrt{(\mu(\bar{X}_p))^2 + \sigma^2} \quad (4.2)$$

Uma das hipóteses que permite a redução das incertezas estatísticas está relacionada com a execução de um número elevado de medições. Por outro lado, e de forma a reduzir a variabilidade das medições efetuadas utiliza-se o critério de Chauvenet. Este critério permite verificar se num conjunto de dados existe um valor que é discrepante (do inglês, *outlier*) face aos restantes valores. Para tal, é necessário calcular a média das concentrações obtidas para cada elemento ( $\mu$ ) e o respetivo desvio padrão ( $\sigma$ ). Posteriormente, calcula-se a distribuição cumulativa normal com base no valor de cada medição ( $X_i$ ),  $\mu$  e  $\sigma$  especificados e, por fim, multiplica-se por  $N$ , tal como é possível observar através da expressão 4.3. Se o resultado desta operação for menor que 0,5 então, o valor é considerado discrepante e é de seguida eliminado. Este procedimento é sucessivamente aplicado até que a condição anterior não se verifique [51].

$$N \times \text{erfc}\left(\frac{|(X_i - \mu)|}{\sigma}\right) < 0,5 \quad (4.3)$$

Onde  $\text{erfc}$  corresponde ao integral da função de densidade de probabilidade, calculado através da seguinte expressão:

$$\text{erfc}(x) = 1 - \text{erf}(x),$$

onde

$$\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \times \int_0^x e^{-t^2} dt \quad (4.4)$$

## 4.7 Exatidão do Método Analítico

Após a obtenção dos espectros, através do espectrómetro de  $\mu$  - EDXRF, a fase seguinte consistiu em determinar a área do pico correspondente a cada um dos elementos e, posteriormente, convertê-la em concentração. Recorreu-se, para tal, ao pacote do software WinAXIL<sup>TM</sup> (do inglês, "*Analysis of X-ray spectra by Iterative Least-squares fitting*") e a quantificação foi realizada através do modo comparativo, usando três amostras padrão (Bush Branches GBW 07603, Poplar Leaves GBW 07604 e Orchard Leaves NBS 1571), com elementos e concentrações conhecidas. A base do funcionamento do modo comparativo pode ser explicada através da reta de calibração construída pelo WinAXIL<sup>TM</sup> para cada um dos elementos presentes nos padrões (figura 4.1). Desta forma, a partir das contagens obtidas através da análise das amostras e com base nas retas de calibração, é possível obter as concentrações dos elementos presentes nos grãos de trigo.

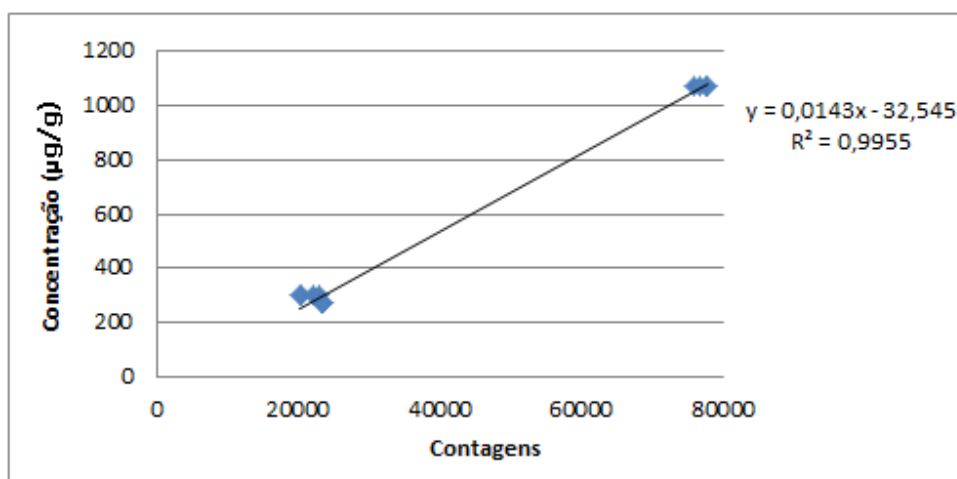


Figura 4.1: Reta de calibração para o Fe obtida a partir da análise dos materiais de referência GBW 07603, GBW 07604 e NBS 1571. No eixo horizontal é possível observar as contagens obtidas através da deconvolução dos espectros de  $\mu$ -EDXRF, enquanto no eixo vertical encontra-se presente a concentração de Fe certificada em cada um dos padrões analisados.

A exatidão do método analítico foi verificada com base na análise das três amostras padrão, comparando-se os valores de concentração medidos com os valores identificados pelos laboratórios que fornecem as amostras padrão. Uma análise das tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 permitem concluir que os valores se encontram em concordância, à exceção das concentrações do Zn e do Ti que, na amostra padrão Bush Branches e Poplar Leaves, respetivamente, se encontram em ligeira discordância com os valores certificados. No entanto, tal facto não é preocupante uma vez que neste estudo o desvio padrão, associado à não homogeneidade da amostra, majora a incerteza das medições, sendo a incerteza estatística pouco significativa, tal como foi descrito anteriormente na secção 4.6.



Tabela 4.1: Comparação das concentrações dos elementos medidos na amostra padrão Bush Branches GBW 07603 com os respectivos valores certificados. Os elementos presentes correspondem aos estudados neste trabalho, sendo os resultados apresentados na forma  $\overline{X_p} \pm \mu(\overline{X_p})_{final}$ .

\* Valor não certificado.

Bush Branches	Valor certificado (g/kg)	Valor medido (g/kg)
Al	$2,0 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,3$
Si	$6,0 \pm 1,4$	$5,0 \pm 0,6$
P	$1,00 \pm 0,08$	$0,90 \pm 0,06$
S	$8,0 \pm 1,2$	$8,0 \pm 0,5$
Cl	19*	$15 \pm 2$
K	$10 \pm 2$	$8,0 \pm 0,4$
Ca	$17 \pm 2$	$16,0 \pm 0,5$
Ti	$0,10 \pm 0,04$	$0,100 \pm 0,003$
Mn	$0,060 \pm 0,011$	$0,060 \pm 0,003$
Fe	$1,10 \pm 0,12$	$1,00 \pm 0,05$
Cu	$0,0070 \pm 0,0017$	$0,0070 \pm 0,0010$
Zn	$0,060 \pm 0,008$	$0,030 \pm 0,005$

Tabela 4.2: Comparação das concentrações dos elementos medidos na amostra padrão Poplar Leaves GBW 07604 com os respectivos valores certificados. Os elementos presentes correspondem aos estudados neste trabalho, sendo os resultados apresentados na forma  $\overline{X_p} \pm \mu(\overline{X_p})_{final}$ .

\* Valor não certificado.

Poplar Leaves	Valor certificado (g/kg)	Valor medido (g/kg)
Si	$7,0 \pm 1,6$	$8,0 \pm 0,5$
P	$1,70 \pm 0,13$	$1,80 \pm 0,12$
S	$4,0 \pm 0,8$	$4,0 \pm 0,3$
Cl	2,3*	$2,0 \pm 0,3$
K	$14,0 \pm 1,5$	$14,0 \pm 0,5$
Ca	$18 \pm 3$	$20,0 \pm 0,7$
Ti	$0,020 \pm 0,005$	$0,030 \pm 0,003$
Mn	$0,050 \pm 0,008$	$0,050 \pm 0,003$
Fe	$0,30 \pm 0,04$	$0,300 \pm 0,015$
Cu	$0,010 \pm 0,002$	$0,0100 \pm 0,0010$
Zn	$0,040 \pm 0,005$	$0,030 \pm 0,005$

Tabela 4.3: Comparação das concentrações dos elementos medidos na amostra padrão Orchard Leaves NBS 1571 com os respectivos valores certificados. Os elementos presentes correspondem aos estudados neste trabalho, sendo os resultados apresentados na forma  $\overline{X}_p \pm \mu(\overline{X}_p)_{final}$ . \* Valor não certificado.

Orchard Leaves	Valor certificado (g/kg)	Valor medido (g/kg)
Si	-	$1,80 \pm 0,17$
P	$2,00 \pm 0,10$	$2,00 \pm 0,15$
S	2,3*	$2,00 \pm 0,10$
Cl	0,70*	$0,90 \pm 0,10$
K	$15,0 \pm 0,3$	$16 \pm 1$
Ca	$20,0 \pm 0,3$	$20,0 \pm 0,6$
Ti	-	$0,040 \pm 0,004$
Mn	$0,090 \pm 0,004$	$0,080 \pm 0,006$
Fe	$0,30 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,03$
Cu	$0,0120 \pm 0,0010$	$0,0120 \pm 0,0010$
Zn	$0,030 \pm 0,003$	$0,040 \pm 0,012$

## Capítulo 5

# Apresentação e Discussão dos Resultados

### 5.1 Análise Qualitativa

#### 5.1.1 Distribuição Elementar nos Grãos de Trigo

Com o objetivo de se desenvolverem estratégias eficazes de biofortificação do trigo, tornou-se necessário o conhecimento prévio da localização dos elementos no grão. Para tal, recorreu-se às imagens do mapeamento do grão, fornecidas pelo espectrômetro de  $\mu$ -EDXRF. As figuras 5.1 e 5.2 ilustram os mapas de distribuição do Fe e do Zn no grão de trigo, respectivamente, para dois tratamentos de adubação diferentes e em sementes de gerações distintas. Através das imagens apresentadas é possível verificar que, independentemente do tratamento de adubação aplicado ou da geração das sementes, a distribuição espacial dos elementos no grão de trigo de cada espécie é semelhante. As imagens do mapeamento dos restantes elementos estudados encontram-se em anexo (Apêndice B).

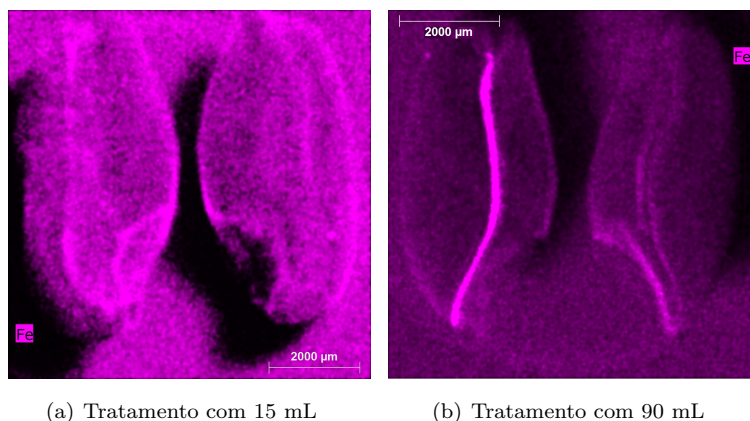


Figura 5.1: Imagens da distribuição espacial do Fe no grão de *Triticum durum* Desf. (trigo duro) para os tratamentos de adubação com 15 mL (a) e 90 mL (b) da solução nutritiva completa, cuja composição foi descrita na secção 4.2.

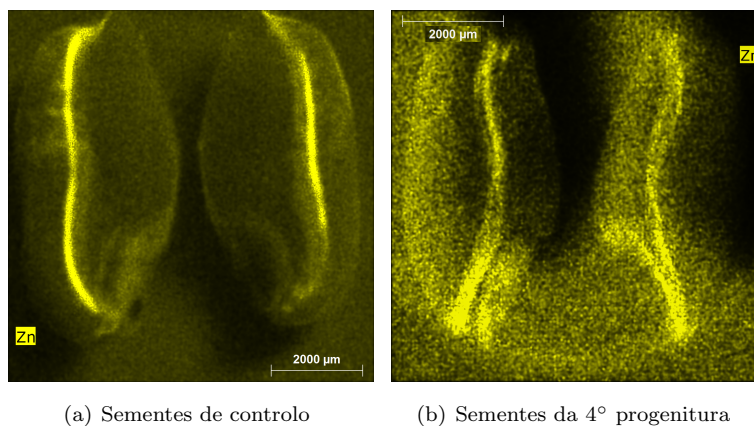


Figura 5.2: Imagens da distribuição espacial do Zn no grão de *Triticum aestivum* L. (trigo mole) proveniente de sementes de diferentes gerações. (a) Sementes de controlo e (b) Sementes da 4<sup>o</sup> progenitura.

Na figura 5.3 observa-se a localização simultânea dos diversos elementos presentes no grão de trigo. Tal como se pode verificar, os elementos não se encontram concentrados numa só estrutura, distribuindo-se pelas várias estruturas existentes no grão de trigo, inclusive pelas diversas camadas que revestem o endosperma. Estas distribuições ocorrem segundo o mesmo padrão, quer isto dizer que independentemente da espécie de trigo analisada, *Triticum durum* Desf. (trigo duro) ou *Triticum aestivum* L. (trigo mole), os elementos apresentam sempre a mesma distribuição espacial. Na camada de células da aleurona encontra-se o P, o qual reveste todo o endosperma, encontrando-se também presente na região do embrião. Na camada seguinte (tecido nucelar) é possível observar a presença do Fe, sendo esta camada também ocupada por outro elemento, Mn, tal como se pode observar na figura 5.3, onde é visível a sobreposição do vermelho (cor associada ao Fe) com o amarelo (cor associada ao Mn). Esta situação pode ser explicada pelo facto do Mn ser considerado um membro da família do Fe e, por isso, ambos os elementos apresentam propriedades físicas e químicas bastante semelhantes [52]. Nas camadas seguintes é possível verificar a presença do Zn e do Ca (figura 5.3(a)). No que diz respeito ao potássio (K), este elemento encontra-se presente na camada mais externa do grão de trigo (epiderme), tal como se pode verificar na figura 5.3(b).

As designações dos tratamentos de adubação estão relacionadas com as quantidades da solução nutritiva completa aplicada no solo das plantas de trigo. Assim sendo, o número que se encontra entre parênteses retos diz respeito à quantidade da solução nutritiva aplicada, ou seja, no tratamento [15] (ou controlo) são adicionados 15 mL da solução nutritiva completa, sendo esta quantidade considerada como padrão no processo de rega de qualquer planta e, daí, a designação de controlo. No tratamento [90] são adicionados 90 mL da mesma solução nutritiva completa.

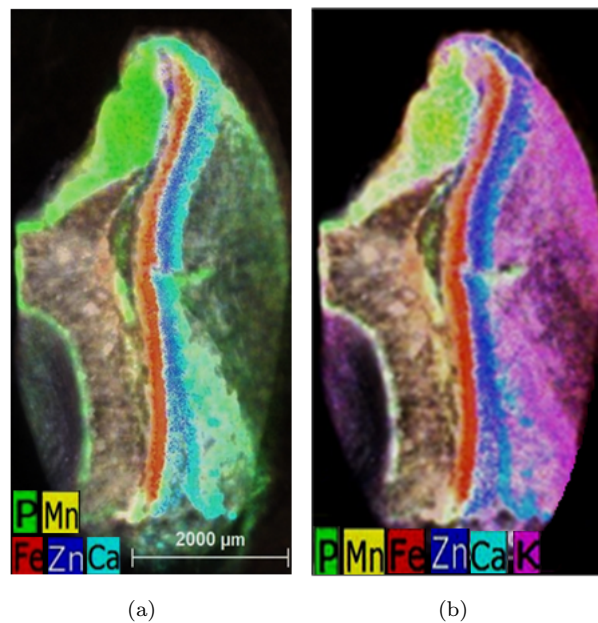


Figura 5.3: Imagens do mapeamento de um grão de trigo mole biofortificado, obtidas através da técnica de  $\mu$ -EDXRF, onde através de um sistema de cores é possível, simultaneamente, observar a localização dos minerais como P, Mn, Fe, Zn e Ca (a) e P, Mn, Fe, Zn, Ca e K (b).

## 5.2 Análise Quantitativa

### 5.2.1 Análise por $\mu$ - EDXRF

As imagens de mapeamento apresentadas anteriormente apenas nos informam acerca dos elementos presentes e o modo como eles se distribuem pelas diversas estruturas do grão. No entanto, para obter informação quantitativa foi necessário realizar o processo de quantificação descrito na secção 3.3.2. Neste estudo utilizaram-se seis grãos de trigo por cada um dos tratamentos de adubação e por cada uma das gerações de sementes, o que resulta num total de vinte e quatro grãos estudados.

Com base nos resultados apresentados na figura 5.4, é possível verificar que o K é o elemento mais abundante na parte exterior do grão (farelo), o que confirma os resultados observados anteriormente na secção 5.1.1.

De um modo geral, as concentrações obtidas no farelo para os dois tratamentos de adubação têm tendência a ser próximas, o que significa que não existe uma grande alteração na concentração dos elementos presentes nesta estrutura do grão de um tratamento para o outro. Os dados relativos à figura 5.4 encontram-se tabelados no apêndice C (tabela C.1).

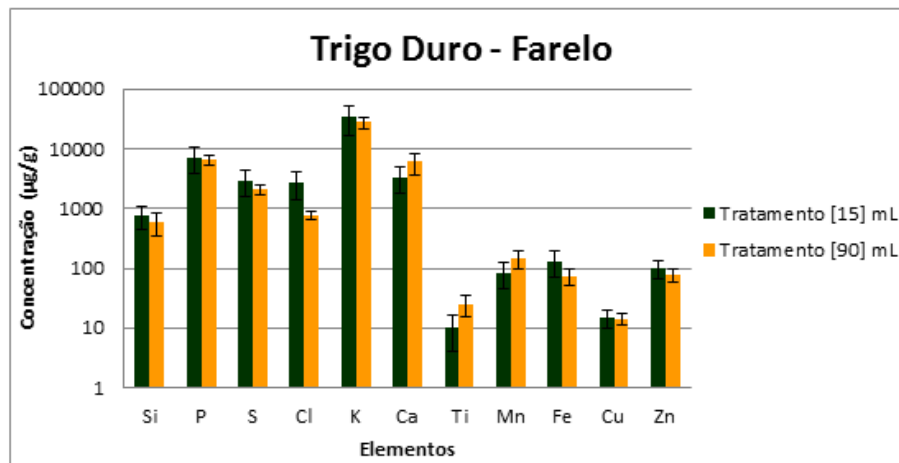


Figura 5.4: Comparação da concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação no farelo de *Triticum durum* Desf. (trigo duro). Os resultados são apresentados na forma  $\overline{X}_p \pm \mu(\overline{X}_p)_{final}$ .

O escutelo corresponde à parte mais externa do embrião que faz fronteira com outra estrutura do grão, denominada por endosperma, tal como se pode observar na figura 2.2. No escutelo é possível verificar que a concentração de diversos elementos, para o tratamento de adubação com 90 mL da solução nutritiva completa, tem tendência a aumentar quando comparada com as concentrações dos mesmos elementos registadas para o tratamento onde se utiliza apenas 15 mL da solução nutritiva. Os elementos para os quais o aumento da concentração é mais acentuado são o fósforo (P), o potássio (K), o manganês (Mn) e o ferro (Fe). Verifica-se, também, uma tendência de aumento na concentração do zinco (Zn) para o tratamento [90], no entanto este aumento não é tao acentuado como o observado para os elementos referidos anteriormente. Em relação aos restantes elementos, é possível verificar que as suas concentrações se encontram relativamente próximas em ambos os tratamentos. Os dados relativos à figura 5.5 encontram-se tabelados no apêndice C (tabela C.2).

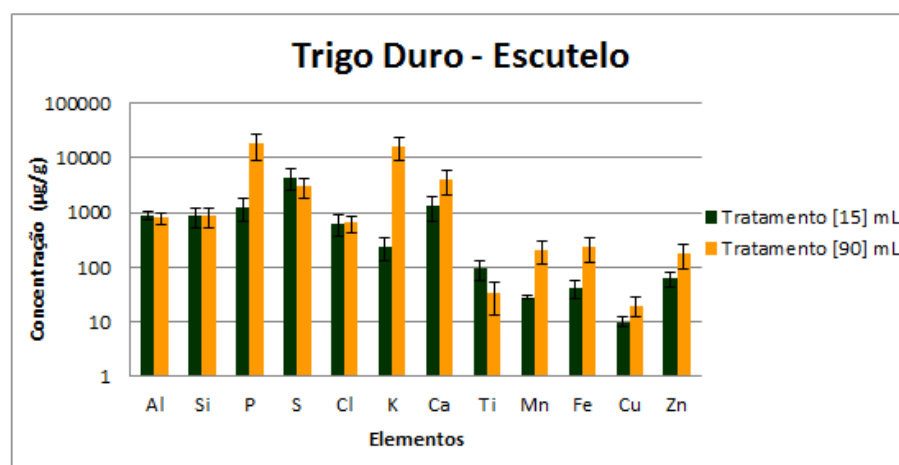


Figura 5.5: Comparação da concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação no escutelo do embrião de *Triticum durum* Desf. (trigo duro). Os resultados são apresentados na forma  $\overline{X}_p \pm \mu(\overline{X}_p)_{final}$ .

A radícula corresponde à parte interna do embrião, tal como se pode observar na figura 2.2. O comportamento observado nesta estrutura do grão é bastante semelhante ao observado anteriormente para o escutelo, ou seja, o fósforo (P), o potássio (K), o manganês (Mn) e o ferro (Fe) são os elementos cujas concentrações, resultantes da aplicação do tratamento de adubação com 90 mL da solução nutritiva completa, têm tendência a ser superiores quando comparadas com as concentrações dos mesmos elementos registadas para o tratamento de adubação onde é aplicado apenas 15 mL da solução nutritiva.

Tal como se encontra representado na figura 5.6, a presença de alumínio (Al) nesta estrutura do grão apenas se observa no tratamento [15] mL, o que pode ser explicado pelo facto de com o aumento da concentração de minerais no grão e, devido à absorção na amostra, exista uma atenuação significativa na deteção do Al, principalmente, se tivermos em conta que para este tipo de matriz o limite de deteção do Al encontra-se bastante próximo da concentração observada para o tratamento [15] mL. Os dados relativos à figura 5.6 encontram-se tabelados no apêndice C (tabela C.3).

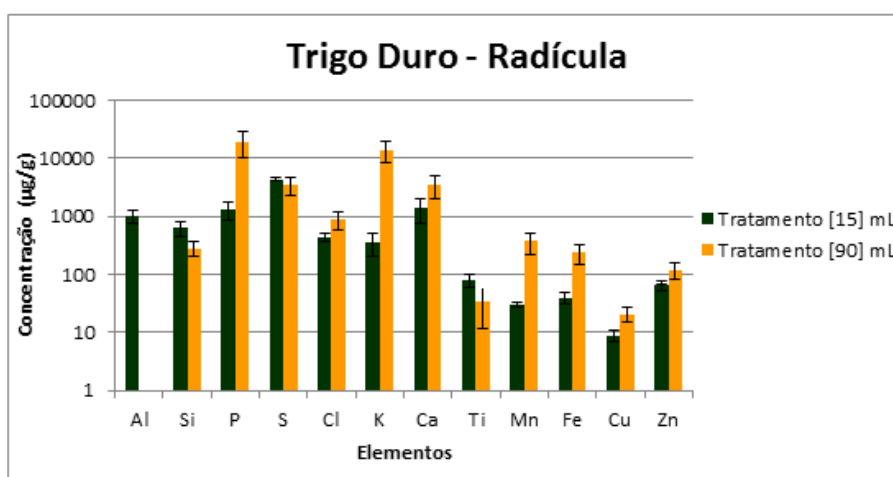


Figura 5.6: Comparação da concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação na radícula do embrião de *Triticum durum* Desf. (trigo duro). Os resultados são apresentados na forma  $\overline{X}_p \pm \mu(\overline{X}_p)_{final}$ .

A nervura corresponde à junção dos dois lados do farelo, tal como se pode observar na figura 2.3. Nesta estrutura do grão os elementos têm um comportamento muito semelhante para ambos os tratamentos de adubação, com exceção para o manganês (Mn) cuja concentração tem tendência a ser superior no tratamento de adubação com 90 mL da solução nutritiva completa. Tal como foi referido anteriormente para a radícula, também na nervura, o alumínio (Al) apenas se observa no tratamento [15] mL. Os dados relativos à figura 5.7 encontram-se tabelados no apêndice C (tabela C.4).

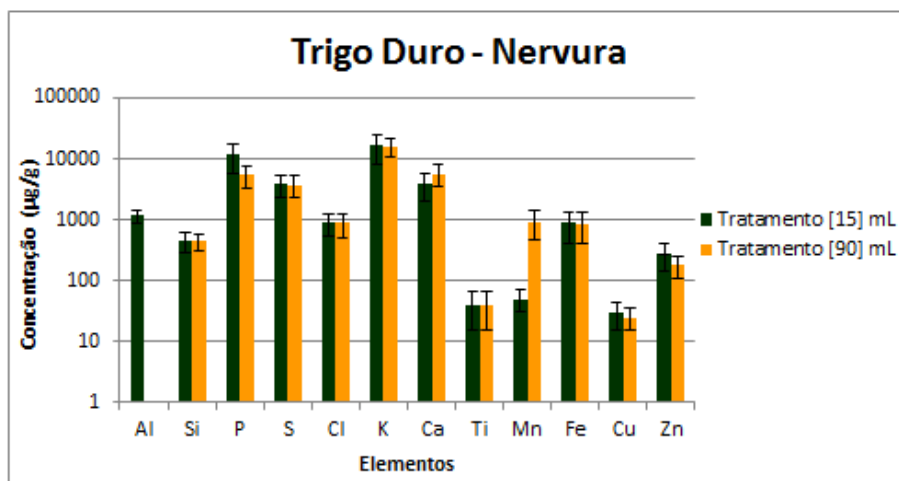


Figura 5.7: Comparação da concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação na nervura do grão de *Triticum durum* Desf. (trigo duro). Os resultados são apresentados na forma  $\overline{X}_p \pm \mu(\overline{X}_p)_{final}$ .

Com base nas figuras apresentadas anteriormente, as quais refletem os resultados obtidos para os dois tratamentos de adubação em diferentes estruturas do grão, verifica-se que é na nervura onde a concentração dos elementos é, tendencialmente, maior comparativamente às restantes estruturas. No entanto, a diferença das concentrações elementares entre os dois tratamentos de adubação tende a ser mais acentuada no embrião (escutelo e radícula), nomeadamente, para os elementos como o fósforo (P), o potássio (K), o manganês (Mn), o ferro (Fe) e o zinco (Zn). No caso do ferro, a concentração medida no embrião (escutelo e radícula) para o tratamento [90] mL é, aproximadamente, 6 vezes superior ao registado para o tratamento [15] mL. No que diz respeito ao zinco, o aumento da concentração entre os dois tratamentos de adubação é um pouco mais baixo, registando-se para o tratamento [90] mL uma concentração no escutelo 3 vezes superior ao registado para o tratamento [15] mL, ao passo que na radícula apenas se verifica um aumento da concentração para o dobro do que foi registado inicialmente no tratamento [15] mL. Os valores das concentrações apresentados anteriormente resultam do cálculo da média ponderada de um conjunto de dados, obtidos através da análise pontual. Optou-se pela média ponderada em vez da média aritmética uma vez que as incertezas individuais de cada medição diferem entre si.

No que diz respeito ao *Triticum aestivum* L. (trigo mole), as análises basearam-se no estudo da biofortificação dos grãos de trigo provenientes de sementes controlo e sementes da 4.ª progenitura, as quais foram submetidas, durante várias gerações, a uma concentração de nutrientes cada vez mais elevada. Os resultados destas análises encontram-se apresentados de seguida.

Com base na figura 5.8, é possível observar a presença de Al apenas nas sementes da 4.ª progenitura, ao mesmo tempo que se observa uma tendência de aumento do silício (Si) das sementes de controlo para as sementes da 4.ª progenitura. No que diz respeito aos restantes elementos, estes tendem a apresentar uma concentração relativamente próxima para as duas gerações de sementes. Tal como foi observado anteriormente no farelo do *Triticum durum* Desf. (trigo duro), também neste caso, se verifica a presença abundante dos elementos como o P, K e Ca. Os dados relativos à figura 5.8 encontram-se tabelados no apêndice C (tabela C.5).



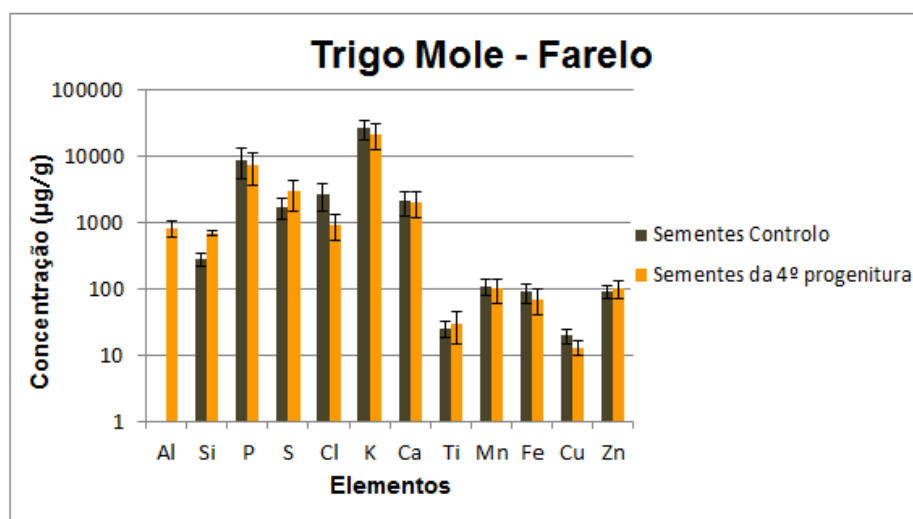


Figura 5.8: Comparação da concentração elementar obtida no farelo para os grãos de *Triticum aestivum* L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações. Os resultados são apresentados na forma  $\bar{X}_p \pm \mu(\bar{X}_p)_{final}$ .

Tal como foi observado na estrutura anterior, também no escutelo (figura 5.9), o Al apenas se encontra presente nos grãos de trigo provenientes das sementes da 4ª progenitura. Verifica-se, ainda, uma tendência de redução da concentração de cloro (Cl) das sementes de controlo para as sementes da 4ª progenitura, enquanto que a concentração de Ca é, tendencialmente, maior quando comparada com a concentração registada nos grãos provenientes das sementes de controlo. Em relação aos restantes elementos, estes apresentam concentrações relativamente semelhantes para ambas as gerações de sementes. Os dados relativos à figura 5.9 encontram-se tabelados no apêndice C (tabela C.6).

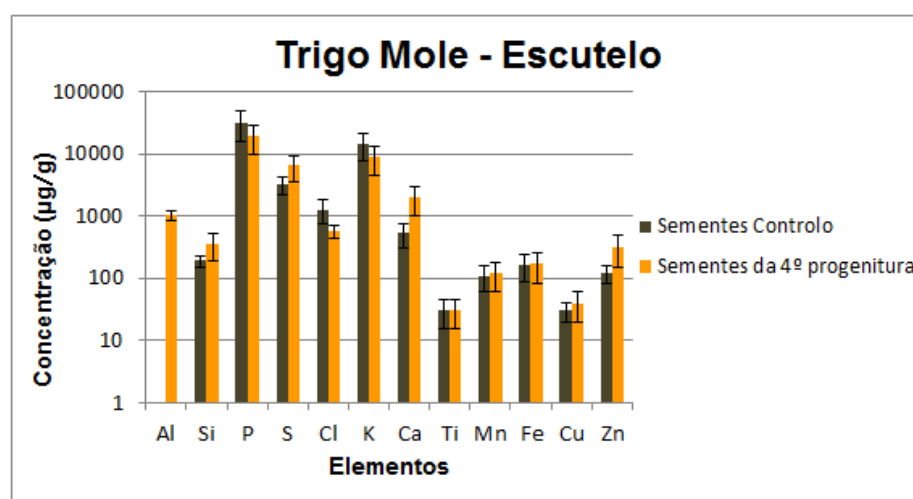


Figura 5.9: Comparação da concentração elementar obtida no escutelo para os grãos de *Triticum aestivum* L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações. Os resultados são apresentados na forma  $\bar{X}_p \pm \mu(\bar{X}_p)_{final}$ .

Os resultados apresentados na figura 5.10, referentes à radícula do *Triticum aestivum* L. (trigo

mole), têm um comportamento semelhante aos apresentados na figura 5.9, referentes ao escutelo do grão de trigo do mesmo genótipo, ou seja, o Al encontra-se presente apenas nos grãos provenientes das sementes da 4<sup>o</sup> progenitura, tal como foi observado anteriormente. No entanto, através da análise pontual foi possível detetar, nos grãos provenientes das sementes de controlo, um ponto com este elemento e com uma concentração de  $(5500 \pm 800) \mu\text{g/g}$ . Relativamente ao Cl, verifica-se uma tendência de redução da sua concentração, das sementes de controlo para as sementes da 4<sup>o</sup> progenitura, enquanto o Ca regista, precisamente, um comportamento inverso a este. Verifica-se, ainda, que a concentração de Ti nos grãos de trigo provenientes das sementes da 4<sup>o</sup> progenitura tem tendência a aumentar. Os dados relativos à figura 5.10 encontram-se tabelados no apêndice C (tabela C.7).

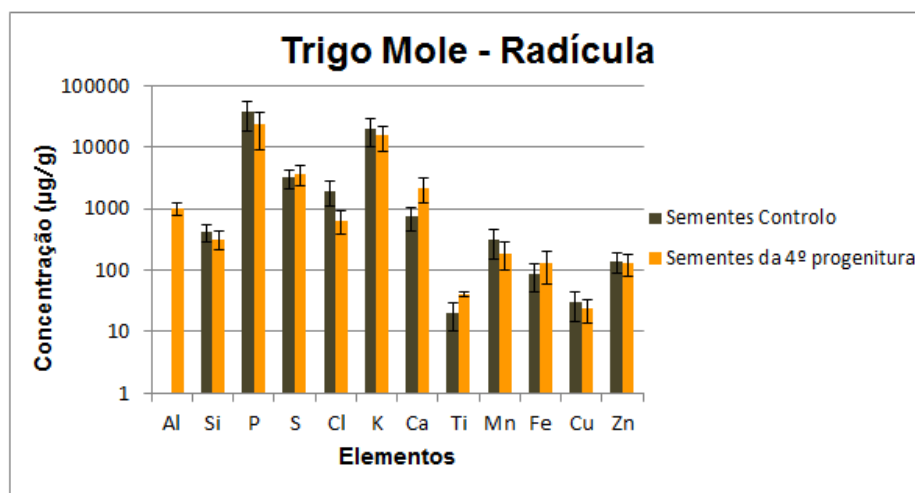


Figura 5.10: Comparação da concentração elementar obtida na radícula para os grãos de *Triticum aestivum* L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações. Os resultados são apresentados na forma  $\overline{X}_p \pm \mu(\overline{X}_p)_{final}$ .

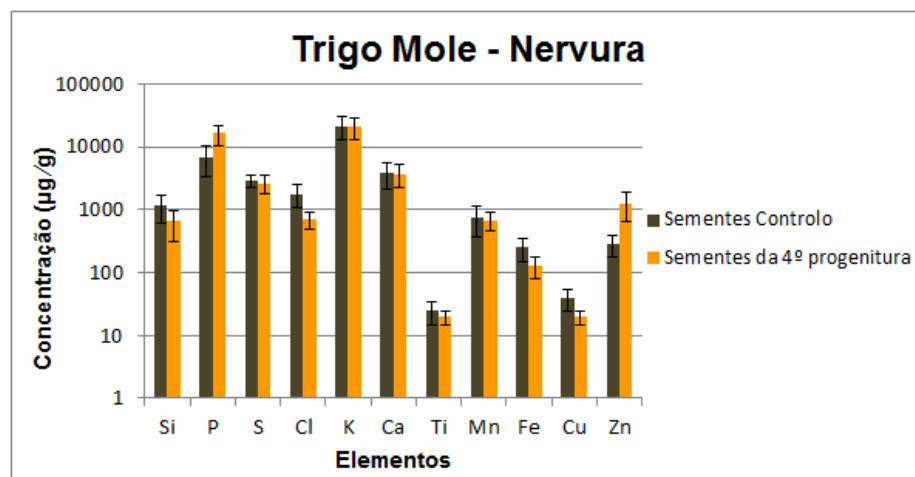


Figura 5.11: Comparação da concentração elementar obtida na nervura para os grãos de *Triticum aestivum* L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações. Os resultados são apresentados na forma  $\overline{X}_p \pm \mu(\overline{X}_p)_{final}$ .

Com base na figura 5.11, é possível verificar que nesta estrutura do grão (nervura) não se

verifica a presença de Al em nenhuma das gerações de sementes. As concentrações elementares tem tendência a apresentarem-se relativamente próximas para os grãos provenientes de ambas as gerações de sementes, com exceção para o Cl, cuja concentração diminui ligeiramente nos grãos provenientes das sementes da 4<sup>o</sup> progenitura e para o Zn, cuja concentração tem tendência a aumentar dos grãos provenientes das sementes de controlo para aqueles que provêm das sementes da 4<sup>o</sup> progenitura. Os dados relativos à figura 5.11 encontram-se tabelados no apêndice C (tabela C.8).

Com base nas figuras apresentadas anteriormente, as quais refletem os resultados obtidos para os grãos de *Triticum aestivum* L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações, é possível verificar que a nervura corresponde à estrutura do grão onde os elementos mais pesados, como é o caso do Mn, Fe e Zn apresentam concentrações, tendencialmente, maiores em comparação com as concentrações obtidas para os mesmos elementos nas restantes estruturas do grão. No que diz respeito às duas gerações de sementes, é possível verificar que a diferença entre as concentrações dos elementos é mais acentuada para o Zn, sendo esta diferença observada na nervura, onde os grãos provenientes das sementes da 4<sup>o</sup> progenitura registam uma concentração de Zn, aproximadamente, 5 vezes superior ao registado para a mesma estrutura nos grãos que provêm das sementes de controlo. Os valores das concentrações apresentados anteriormente resultam do cálculo da média ponderada de um conjunto de dados, obtidos através da análise pontual. Optou-se pela média ponderada em vez da média aritmética uma vez que as incertezas individuais de cada medição diferem entre si.

### 5.2.2 Análise por Espectrofotometria de Absorção Atómica

A análise por espectrofotometria de absorção atómica permitiu estudar alguns dos mecanismos existentes nas plantas, como é o caso da absorção radicular e da translocação para a parte aérea. Esta análise foi realizada com base nos dados que, gentilmente, foram cedidos pelos colaboradores do DCT da FCT-UNL. Os resultados apresentados de seguida referem-se ao estudo de duas partes distintas (raiz e parte aérea) da planta de *Triticum durum* Desf. (trigo duro), a qual foi submetida a quatro tratamentos de adubação diferentes.

Os tempos de colheita apresentados para cada um dos elementos das figuras seguintes referem-se aos períodos experimentais, após a germinação, em que se procedeu ao estudo da concentração elementar. Desta forma, t1 (controlo), t2, t3 e t4 correspondem, respetivamente, ao 16<sup>o</sup>, 70<sup>o</sup>, 92<sup>o</sup> e 126<sup>o</sup> dia após a germinação. Os tratamentos [15] mL, [30] mL, [60] mL e [90] mL dizem respeito aos diferentes tratamentos de adubação onde são aplicados 15 mL, 30 mL, 60 mL e 90 mL da solução nutritiva completa, respetivamente, nos diversos substratos onde se encontram as plantas de trigo.

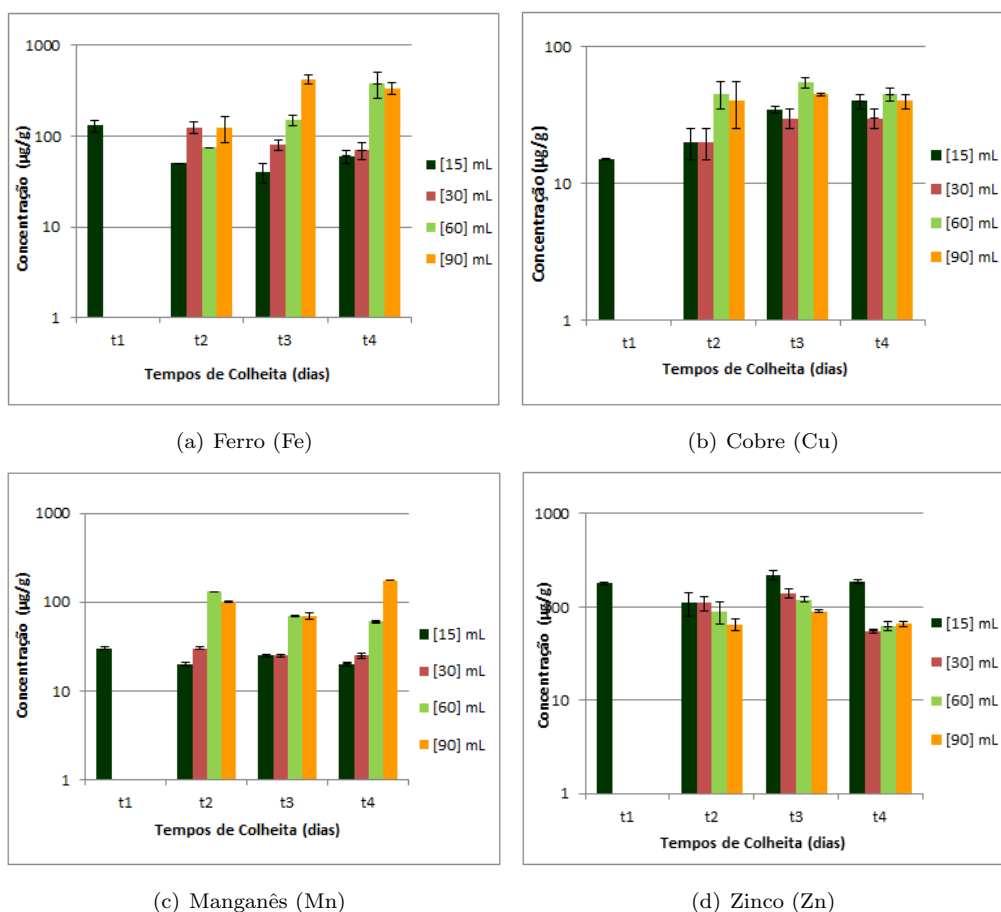


Figura 5.12: Concentração média de micronutrientes na raiz, a qual foi submetida a quatro tratamentos de adubação distintos, em função dos diferentes tempos de colheita.

A concentração do Fe na raiz, para os tratamentos [15] mL e [30] mL, apresenta um comportamento bastante semelhante entre os diferentes tempos de colheita, enquanto que para os tratamentos [60] mL e [90] mL verifica-se um aumento significativo da concentração deste elemento ao longo do tempo. O tempo de colheita t3 (92º dia após a germinação) corresponde ao período experimental onde se verifica um aumento linear da concentração do Fe em função dos diferentes tratamentos de adubação, ao passo que no tempo de colheita t2 (70º dia após a germinação) não se verificam variações significativas entre os diferentes tratamentos. Por fim, no tempo de colheita t4 (126º dia após a germinação) a variação mais acentuada ocorre do tratamento [30] mL, aproximadamente igual ao tratamento [15] mL, para o tratamento [60] mL, tal como se pode observar na figura 5.12(a).

Em relação ao Cu, figura 5.12(b), não se verificam variações significativas entre os diferentes tratamentos de adubação, com exceção para o tempo de colheita t2 e t3 onde se verifica um ligeiro aumento da concentração do Cu no tratamento [60] mL, em comparação aos tratamentos anteriores.

Relativamente ao Mn, a concentração deste elemento na raiz, para os tratamentos [15] mL e [30] mL é, aproximadamente, igual ao longo dos diferentes tempos de colheita. No entanto, entre os tratamentos de adubação verificam-se alterações significativas na concentração do elemento, nomeadamente, no tempo de colheita t2 e t4, sendo que neste último tempo se regista um aumento da concentração do Mn à medida que a quantidade da solução nutritiva aplicada aumenta (figura

5.12(c)).

A concentração do Zn na raiz diminui significativamente em cada período experimental, entre o tratamento [15] mL e o tratamento [30] mL, com exceção para o tempo de colheita t2 onde as concentrações dos diferentes tratamentos são relativamente próximas. No tempo de colheita t4 é onde se regista uma diminuição mais acentuada da concentração do Zn, ao passo que o tempo de colheita t3 (92º dia após a germinação) regista as maiores concentrações para os diferentes tratamentos de adubação, tal como se pode observar na figura 5.12(d).

Com base na figura 5.12, é possível verificar um aumento significativo da absorção radicular de micronutrientes, à exceção do Zn. Nem sempre este aumento apresenta um comportamento linear, o que significa que a concentração dos elementos varia entre os diferentes tratamentos de adubação e/ou ao longo dos tempos de colheita. Entre os micronutrientes apresentados, o que regista maior concentração na raiz é o Fe. Os dados relativos à figura 5.12 encontram-se tabelados no apêndice D (tabela D.1).

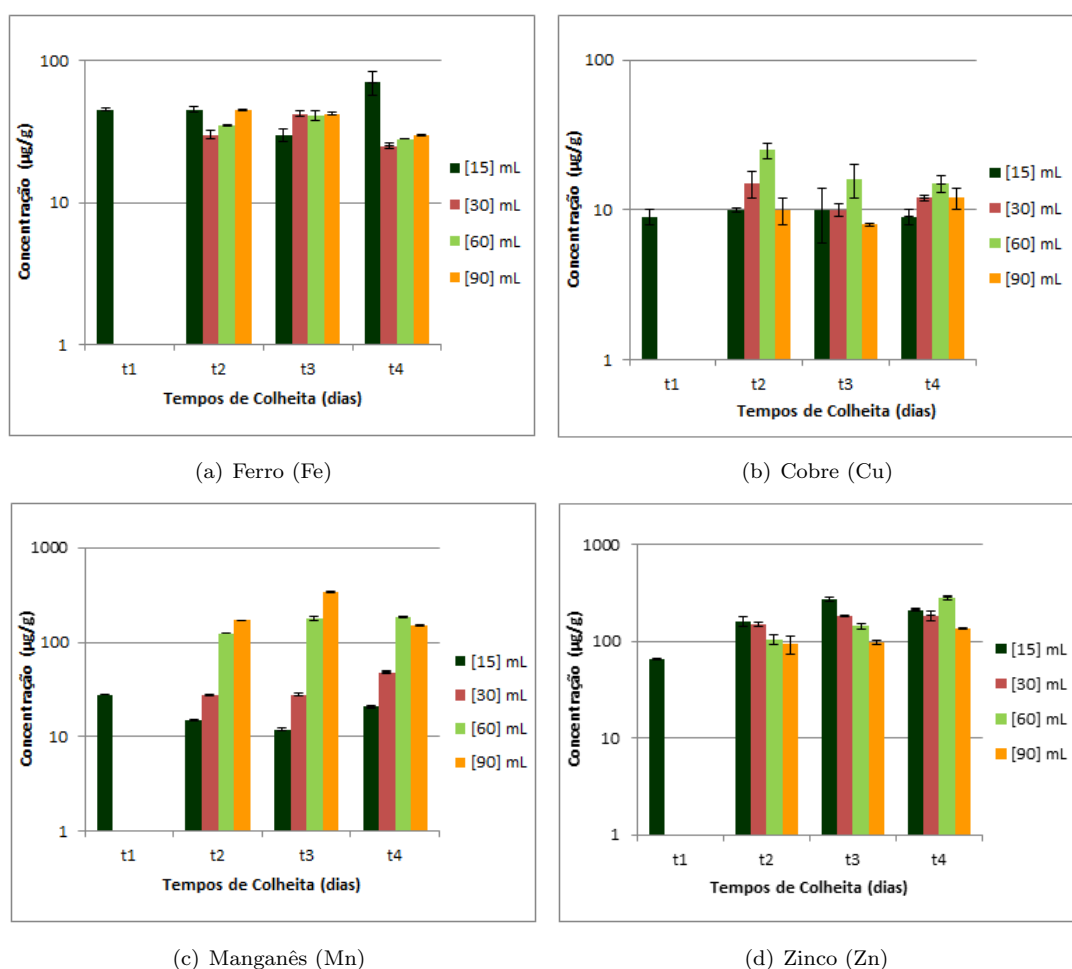


Figura 5.13: Concentração média de micronutrientes na parte aérea, resultante da aplicação de quatro tratamentos de adubação distintos, em função dos diferentes tempos de colheita.

A concentração do Fe na parte aérea da planta varia ligeiramente entre os diferentes tratamentos de adubação e tempos de colheita, sendo que a variação mais significativa ocorre no período

experimental t4, com a diminuição da concentração do Fe do tratamento [15] mL, onde se regista a maior concentração deste elemento, para os restantes tratamentos de adubação, os quais apresentam um comportamento bastante semelhante entre si, tal como se pode verificar na figura 5.13(a).

Em relação ao Cu, a maior concentração deste elemento na parte aérea da planta ocorre para o tratamento [60] mL, no tempo de colheita t2. A concentração do Cu associada ao tratamento [15] mL e [30] mL não sofre variações significativas ao longo dos vários tempos de colheita (figura 5.13(b)).

Relativamente ao Mn, figura 5.13(c), é possível observar, em cada um dos tempos de colheita, variações significativas entre os diferentes tratamentos de adubação. Nos períodos experimentais t2 e t3 a concentração do Mn aumenta com o aumento da quantidade da solução nutritiva completa aplicada, enquanto que no tempo de colheita t4 a concentração deste elemento sofre uma ligeira redução para o tratamento [90] mL. A maior concentração do Mn verifica-se para o tratamento [90] mL, no tempo de colheita t3.

A maior concentração do Zn na parte aérea da planta verifica-se para o tratamento [15] mL, no tempo de colheita t3. Neste mesmo período experimental, é ainda possível observar uma diminuição da concentração do Zn à medida que a quantidade da solução nutritiva completa aplicada aumenta. Nos tempos de colheita t2 e t3 as concentrações associadas aos tratamentos [15] mL e [30] mL encontram-se bastante próximas, tal como se pode verificar na figura 5.13(d).

Através da análise da figura 5.13, é possível verificar que, entre os micronutrientes apresentados, o Cu é o elemento que apresenta concentrações mais baixas na parte aérea da planta, ao passo que o Mn, para os tratamentos [60] mL e [90] mL, e o Zn, para todos os tratamentos de adubação, são os micronutrientes que apresentam concentrações mais elevadas nesta estrutura. O mecanismo da translocação de micronutrientes para a parte aérea da planta não apresenta um comportamento bem definido, verificando-se algumas oscilações nas concentrações dos elementos entre os diferentes tratamentos de adubação. Os dados relativos à figura 5.13 encontram-se tabelados no apêndice D (tabela D.2).

Com base nas figuras 5.12 e 5.13 verifica-se que as concentrações do Fe e do Cu diminuem, significativamente, ao longo da planta, isto é, da raiz para a parte aérea. O cenário inverso verifica-se para o Zn, ou seja, a concentração deste elemento regista os valores mais elevados na parte aérea da planta. Tal facto pode ser explicado pelas interações antagonistas Zn-Fe e Zn-Cu. As interações Zn-Fe devem-se, essencialmente, à competitividade entre os iões  $Zn^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  e à interferência nos processos de quelação durante os mecanismos de absorção e translocação do ferro desde as raízes até à parte aérea. No que diz respeito às interações Zn-Cu, estas devem-se à existência dos mesmos locais transportadores para os mecanismos de absorção do Zn e do Cu [52].

Em relação aos macronutrientes, verifica-se, por exemplo, que a concentração de Ca na raiz varia ligeiramente entre os diferentes tratamentos de adubação, no entanto, no que se refere aos tempos de colheita, verifica-se um comportamento bastante próximo para os tratamentos [15] mL e [30] mL, ao passo que a concentração associada aos tratamentos [60] mL e [90] mL aumenta ao longo dos diferentes períodos experimentais, o que faz com que a fase final da maturação fisiológica (t4) registre as maiores concentrações para estes tratamentos, tal como se pode observar na figura 5.14(a).

Relativamente ao K, é possível observar, através da figura 5.14(b), que a concentração deste elemento na raiz não sofre variações significativas entre os diferentes tratamentos de adubação, nem ao longo dos tempos de colheita, à exceção do tratamento [90] mL que, no período experimental t4,

registra uma diminuição significativa em relação aos restantes tratamentos e períodos experimentais. O tempo de colheita t3 corresponde ao período experimental onde a concentração de K regista os valores mais elevados para todos os tratamentos de adubação.

Relativamente ao Mg, representado na figura 5.14(c), é possível verificar que a concentração deste elemento se encontra relativamente próxima para os diferentes tratamentos de adubação, à exceção do tratamento [90] mL que, no tempo de colheita t3, apresenta uma concentração de Mg inferior em relação aos restantes tratamentos do mesmo período experimental.

A concentração de P na raiz não apresenta variações significativas entre os diferentes tratamentos de adubação, nomeadamente no que se refere aos tempos de colheita t3 e t4. O tempo de colheita t3 é o período experimental onde os diferentes tratamentos de adubação registam concentrações de P mais elevadas (figura 5.14(d)).

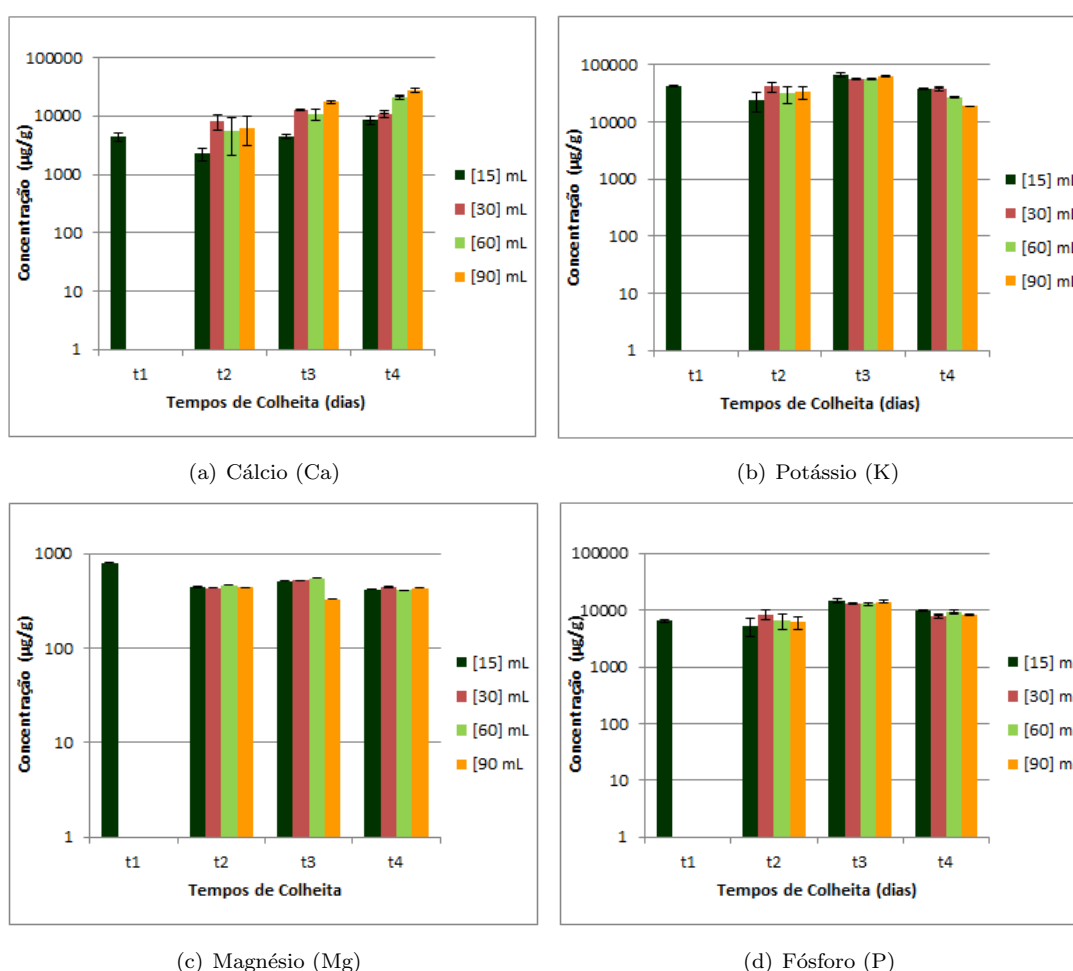


Figura 5.14: Concentração média de macronutrientes na raiz, a qual foi submetida a quatro tratamentos de adubação distintos, em função dos diferentes tempos de colheita.

Com base na figura 5.14, é possível verificar que o K é o macronutriente cuja concentração na raiz é superior para todos os tratamentos de adubação estudados, o que pode ser explicado pelo facto deste elemento apresentar uma elevada mobilidade no sistema solo-planta. Contrariamente, o Mg é o macronutriente que apresenta as concentrações mais baixas na raiz, podendo tal facto dever-se

à existência de interações antagonistas entre o Mg e o Al. O mecanismo de absorção radicular de macronutrientes caracteriza-se por variações pouco significativas entre os diferentes tratamentos de adubação e ao longo dos tempos de colheita. Os dados relativos à figura 5.14 encontram-se tabelados no apêndice D (tabela D.3).

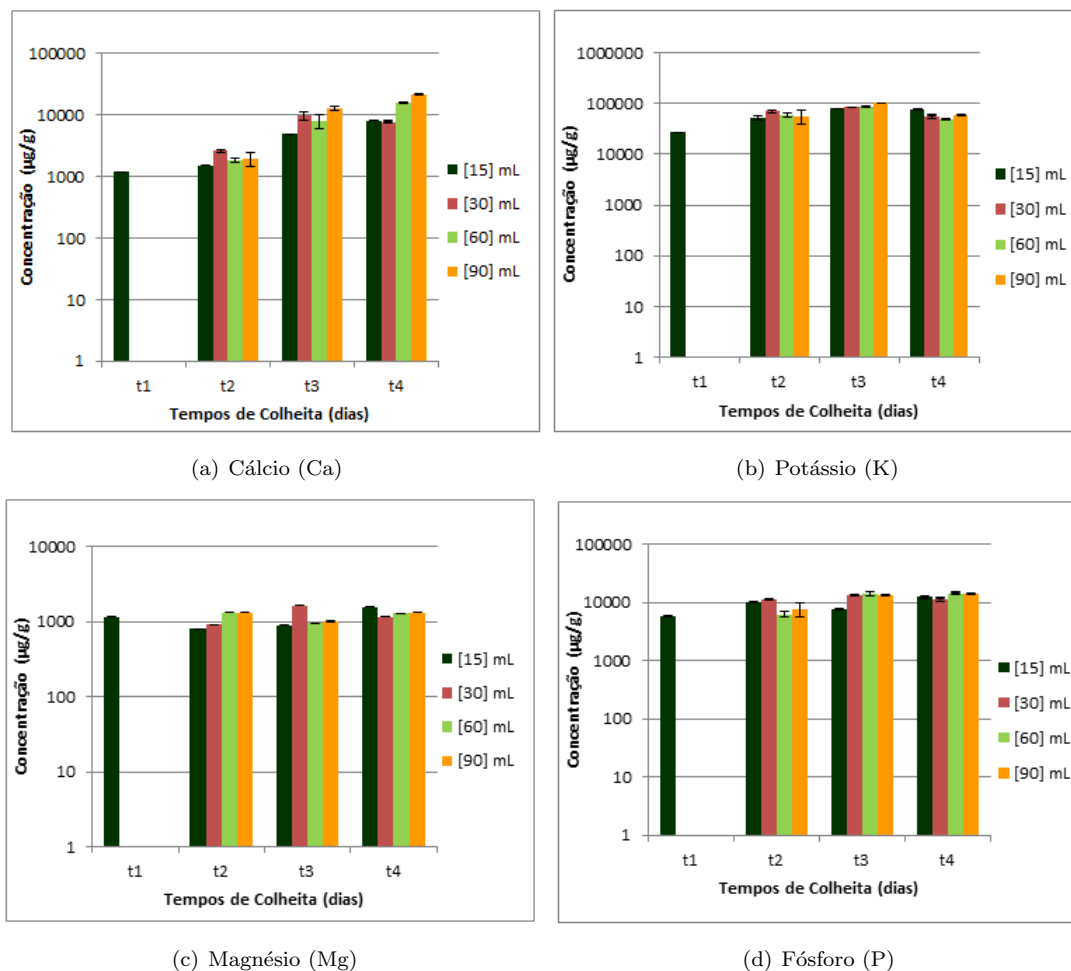


Figura 5.15: Concentração média de macronutrientes na parte aérea, resultante da aplicação de quatro tratamentos de adubação distintos, em função dos diferentes tempos de colheita.

A concentração de Ca na parte aérea aumenta, significativamente, ao longo dos tempos de colheita, nomeadamente, no que diz respeito ao tratamento [15] mL, [60] mL e [90] mL. Desta forma, o tempo de colheita t4 corresponde ao período experimental cujas concentrações de Ca registam os valores mais elevados para todos os tratamentos de adubação estudados, à exceção do tratamento [30] mL que, neste período experimental, apresenta uma diminuição na concentração deste elemento face ao período anterior, tal como se pode observar na figura 5.15(a).

Na parte aérea da planta, a concentração de K apresenta um comportamento semelhante ao observado anteriormente na raiz, ou seja, as concentrações associadas a cada um dos tratamentos não diferem significativamente entre si. No entanto, no que diz respeito aos tempos de colheita, verifica-se um ligeiro aumento da concentração deste elemento de t2 para t3, seguido de uma diminuição. Desta forma, verifica-se que t3 corresponde ao período experimental onde as concentrações de K são mais



elevadas para cada um dos tratamentos de adubação estudados, ao passo que a fase final da maturação fisiológica (t4) é o período onde as concentrações de K são ligeiramente menores (figura 5.15(b)).

Em relação à concentração de Mg na parte aérea, observa-se na figura 5.15(c), um aumento gradual da concentração associada ao tratamento [15] mL. A concentração referente ao tratamento [30] mL aumenta do tempo de colheita t2 para t3 registando, neste último período (t3), o seu maior valor. No que diz respeito aos tratamentos [60] mL e [90] mL, estes apresentam um comportamento bastante semelhante ao longos dos diferentes períodos experimentais, sendo que os seus maiores valores se registam nos tempos de colheita t2 e t4.

Relativamente à concentração de P na parte aérea, não se verificam variações significativas entre os diferentes tratamentos de adubação, em cada um dos períodos experimentais, com exceção do tempo de colheita t2 onde se verifica uma diminuição da concentração de P do tratamento [30] mL para o [60] mL e do tempo de colheita t3, cuja concentração aumenta, ligeiramente, do tratamento [15] mL para o [30] mL. Os menores valores da concentração de P nesta estrutura ocorrem no tempo de colheita t2, para os tratamentos [60] mL e [90] mL, tal como se pode verificar na figura 5.15(d).

Através da análise da figura 5.15, é possível verificar que o Mg, tal como observado anteriormente na raiz, é o macronutriente com as concentrações mais baixas para todos os tratamentos de adubação estudados, apesar de que na parte aérea a concentração deste elemento regista valores superiores aos apresentados na raiz da planta. Na parte aérea não existe nenhum macronutriente com uma presença maioritária verificando-se, em contrapartida, um maior domínio de determinados macronutrientes para diferentes tratamentos e tempos de colheita. Desta forma, no tempo de colheita t4 do Ca registam-se os maiores valores das concentrações associadas ao tratamento [60] mL e [90] mL, enquanto que os tempos de colheita t3 e t4 do P correspondem aos períodos experimentais cujas concentrações referentes aos tratamentos [30] mL e [15] mL, respetivamente, apresentam os maiores valores, comparativamente aos mesmos tratamentos dos restantes macronutrientes. Os dados relativos à figura 5.15 encontram-se tabelados no apêndice D (tabela D.4).

Com base nas figuras 5.14 e 5.15 concluímos que as concentrações dos macronutrientes (K, Mg e P) aumentam da raiz para a parte aérea, ao contrário do que se verifica para o Ca, cuja concentração diminui ao longo da planta. Esta situação pode ocorrer devido à existência de interações antagonistas entre o K e o Ca [52].

Nas tabelas 5.1 e 5.2 a seguir apresentadas, é possível observar o peso seco obtido para a raiz e parte aérea da planta, respetivamente.

Através dos resultados obtidos para a biomassa seca da raiz (tabela 5.1), verifica-se que o tratamento [30] mL é, entre os vários tratamentos de adubação aplicados, aquele cujo peso seco na raiz aumenta, gradualmente, ao longo dos diferentes períodos experimentais registando, em quase todos os tempos de colheita, um peso seco superior ao obtido para os restantes tratamentos de adubação.

Relativamente aos valores obtidos para a biomassa seca da parte aérea (tabela 5.2), verifica-se que os tratamentos [30] mL e [90] mL correspondem aos tratamentos de adubação onde se registam os valores mais elevados do peso seco para esta estrutura da planta.

Tabela 5.1: Biomassa seca da raiz obtida para cada um dos tratamentos de adubação ao longo dos diferentes períodos experimentais.

Tratamentos	Biomassa Seca da Raiz ( $g_{DW}$ )			
	[15] mL	[30] mL	[60] mL	[90] mL
t1	$0,13 \pm 0,03$	—	—	—
t2	$0,500 \pm 0,010$	$0,800 \pm 0,010$	$0,400 \pm 0,010$	$1,000 \pm 0,010$
t3	$0,50 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,08$	$0,80 \pm 0,18$	$0,80 \pm 0,04$
t4	$0,50 \pm 0,02$	$1,20 \pm 0,07$	$0,50 \pm 0,16$	$0,9 \pm 0,3$

Tabela 5.2: Biomassa seca da parte aérea obtida para cada um dos tratamentos de adubação ao longo dos diferentes períodos experimentais.

Tratamentos	Biomassa Seca da Parte Aérea ( $g_{DW}$ )			
	[15] mL	[30] mL	[60] mL	[90] mL
t1	$0,30 \pm 0,03$	—	—	—
t2	$4,0 \pm 0,3$	$7,0 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,7$	$8,0 \pm 1,9$
t3	$3,0 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,6$	$7,0 \pm 1,7$	$7,0 \pm 0,3$
t4	$4,0 \pm 0,9$	$10,0 \pm 1,4$	$7,0 \pm 1,2$	$11 \pm 5$

Com base nas concentrações médias (representadas por  $[nutriente]_{média}$ ) de macro e micro-nutrientes registadas nas diferentes estruturas da planta e nos valores obtidos para o peso seco (DW - *Dry Weight*) dessas mesmas estruturas, é possível calcular a acumulação total de macro e micro-nutrientes ( $A_{total}$ ) na raiz, parte aérea e grão de trigo, em unidades de massa, através da seguinte expressão:

$$A_{total} = [nutriente]_{média} \times DW \quad (5.1)$$

Os valores calculados através da expressão 5.1 encontram-se tabelados no apêndice D (tabelas D.5 e D.6). Face aos resultados obtidos, é possível verificar que, na fase final da maturação fisiológica (t4), a maior acumulação média de macro e micronutrientes nos grãos de trigo ocorre para o tratamento [30] mL, ou seja, para o tratamento de adubação onde são aplicados no solo 30 mL da solução nutritiva completa, enquanto que na raiz e parte aérea os maiores valores da acumulação de minerais distribuem-se pelos tratamentos [30] mL, [60] mL e [90] mL, independentemente do período experimental considerado.

## Capítulo 6

# Eucalipto

### 6.1 Contaminação dos Solos

O solo é um recurso natural que se caracteriza por uma enorme multifuncionalidade, servindo de suporte a grande parte dos seres vivos e, como tal, é constituído por matéria mineral, matéria orgânica, água e ar [53].

Segundo a Ref. [54], “Contrariamente à água e ao ar, a contaminação dos solos é bastante mais complexa, na medida em que ocorrem fortes interações entre os contaminantes e os componentes do solo, bem como entre os próprios contaminantes.” Dados os vários impactos (na economia, no ambiente e na saúde pública) que decorrem da contaminação dos solos, torna-se necessária uma intervenção eficaz. A utilização de determinadas plantas capazes de remover, transferir, estabilizar e destruir os contaminantes presentes no solo têm-se revelado como uma possível solução para o problema em causa. Esta metodologia “verde” é designada por fitorremediação [53, 55].

### 6.2 Fitorremediação

A escolha do mecanismo de fitorremediação a aplicar (fitoextração, fitodegradação, fitovolatilização ou fitoestabilização) depende de algumas das características do solo que se pretende descontaminar, nomeadamente a sua densidade e permeabilidade, o pH, a humidade, o tipo e a concentração de metais pesados que se encontram presentes [53]. No entanto, a eficácia desta técnica não depende exclusivamente dos solos, mas também das características apresentadas pelas plantas, denominadas por fitorremediadoras. De entre essas características destaca-se o crescimento rápido, a boa capacidade de absorção, a elevada produção de biomassa, o sistema radicular profundo, a competitividade, a tolerância a determinadas concentrações de metais pesados e a capacidade de desenvolvimento em vários ambientes [56]. Com base no tipo de características enumeradas, as espécies de eucalipto têm sido cada vez mais apontadas como excelentes plantas fitorremediadoras. Exemplo disso são os estudos descritos nas Ref.s [57, 58]. O processo de interação solo-planta desta espécie vegetal pode ser observado através da figura 6.1.

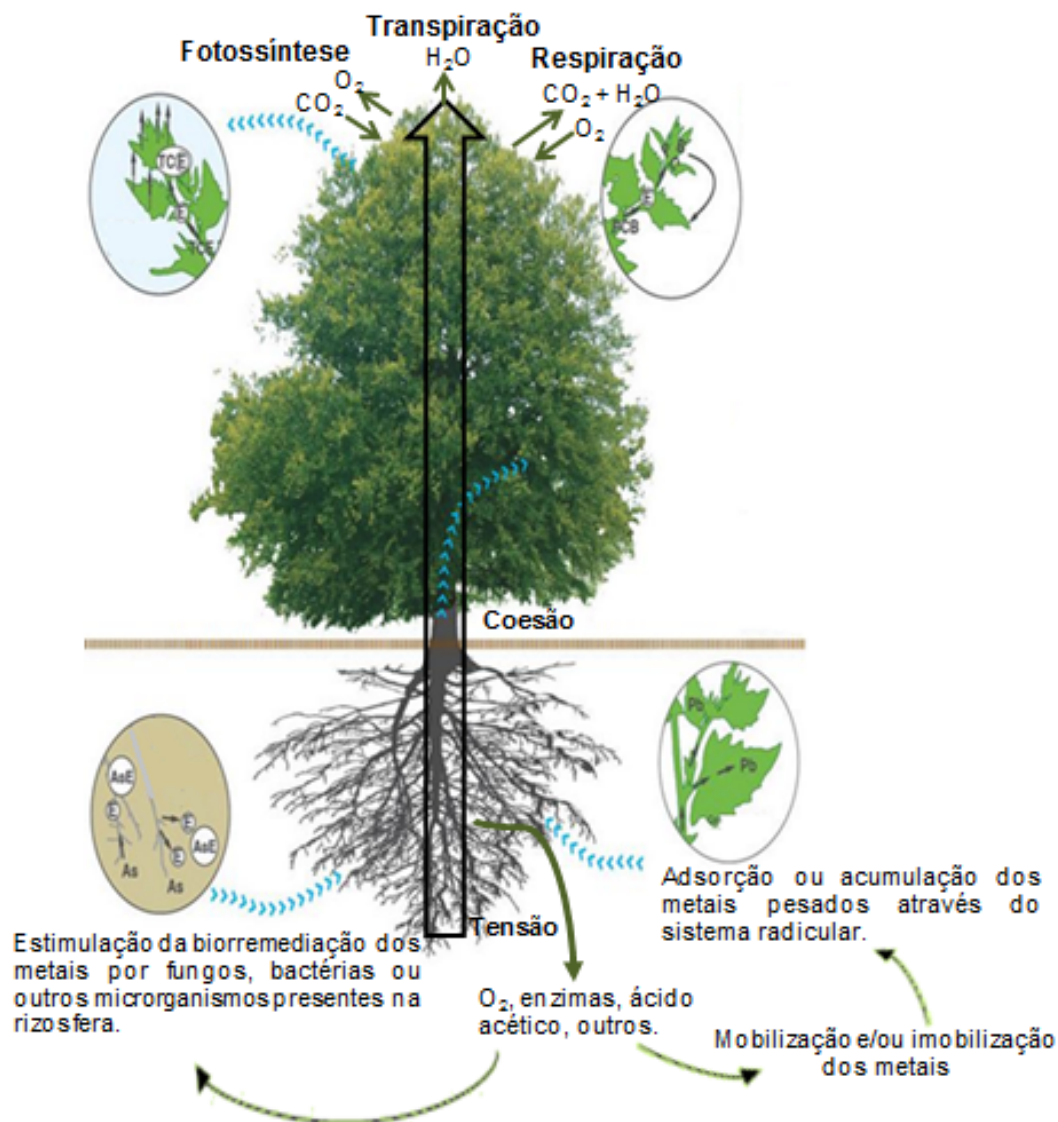


Figura 6.1: Processo de interação solo-planta presente na espécie vegetal do género *Eucalyptus*, onde é possível observar a metodologia de descontaminação dos solos, denominada por fitorremediação (adaptado da Ref. [59]).

### 6.3 Material Biológico

Neste trabalho utilizaram-se duas espécies de eucalipto, *Eucalyptus globulus* Labil, também conhecido por eucalipto comum, e *Eucalyptus nitens* Deane & Maiden. A escolha da espécie *Eucalyptus globulus* deveu-se à sua adaptabilidade em regiões de clima temperado, sendo esta espécie florestal a mais cultivada em Portugal [60]. Relativamente à espécie *Eucalyptus nitens*, a escolha foi motivado pelo facto de ainda não existir qualquer tipo de estudo onde esta espécie seja utilizada na descontaminação dos solos. Em termos de adaptabilidade, e ao contrário da anterior, esta espécie encontra-se mais adaptada a climas frios.

## 6.4 Implementação das Culturas de Eucalipto

As espécies de eucalipto utilizadas neste trabalho são provenientes dos viveiros Altri florestal Portugal, no entanto o processo da contaminação dos solos onde estes se encontram foi realizado pelos colaboradores do DCT da FCT-UNL, num terraço a céu aberto existente no edifício.

Neste estudo foram utilizados vasos com uma capacidade de 4,8 L preenchidos com 3 L de substrato universal SIRA, previamente regado. Foram plantados 30 eucaliptos de cada espécie, realizando-se duas colheitas, por cada eucalipto, em tempos diferentes. A primeira colheita foi realizada 2 meses após a contaminação dos solos e a segunda colheita foi realizada 4 meses após a contaminação dos mesmos.

O elemento utilizado no processo da contaminação do solos foi o arsénio (As), mais concretamente, o composto inorgânico denominado arsenito de sódio ( $\text{NaAsO}_2$ ). O As é um elemento que se encontra presente em alguns produtos usados na agricultura e das duas formas inorgânicas, arsenito AS (III) e o arsenato As (V), o arsenito é o composto inorgânico mais abundante e também o mais solúvel apresentando, assim, uma maior mobilidade e fitotoxicidade comparativamente ao arsenato As (V) [61].

Inicialmente, fez-se uma solução mãe contendo 1000  $\mu\text{g/g}$  de As e a partir dessa solução realizaram-se diluições de 100  $\mu\text{g/g}$  e 200  $\mu\text{g/g}$ . Dessas diluições retiraram-se 100 mL para cada planta. Após a primeira colheita, registaram-se níveis de As no solo inferiores aos registados inicialmente, o que fez com que se procedesse a uma nova contaminação, com a mesma quantidade da solução utilizada no início do processo. Este procedimento foi adotado dado o facto de se pretenderem níveis de As no solo praticamente constantes, de forma a simular a realidade que se verifica nas zonas mineiras, onde os solos se encontram, constantemente, sujeitos a elevados níveis de contaminação.

## 6.5 Preparação das Amostras para Análise por $\mu$ -EDXRF

Com o objetivo de determinar a concentração elementar nas raízes de ambas as espécies de eucalipto, começou-se por cortar cada raiz longitudinalmente, com o auxílio de uma lâmina cirúrgica de aço inoxidável, de forma a obter-se duas partes relativamente homogêneas. Cada uma dessas partes da raiz foi colocada com a estrutura interna voltada para cima sobre fita de carbono, presente na parte exterior das caixas de petri. Posteriormente, através da técnica de  $\mu$ -EDXRF, procedeu-se à análise quantitativa destas mesmas estruturas. As condições de operação do espectrómetro de  $\mu$ -EDXRF foram iguais às utilizadas, anteriormente, na análise dos grãos de trigo.

No caso da análise das folhas dos eucaliptos, não foi necessário realizar nenhum corte nesta estrutura, utilizando-se a folha no seu formato natural.

## 6.6 Resultados

Os dados quantitativos a seguir apresentados foram obtidos no sistema de  $\mu$ -EDXRF (M4 Tornado<sup>TM</sup>, Bruker, Alemanha).

Relativamente aos dados quantitativos obtidos para a raiz da espécie *Eucalyptus globulus*

(figura 6.2), podemos concluir que ao longo do tempo a concentração dos elementos presentes na raiz tem tendência a diminuir, como é o caso da concentração dos seguintes elementos, Cl, K, Cr, Fe, Ni, Cu e Zn. Ao contrário destes, os elementos como o S, Ca e As registam, dos 2 para os 4 meses após a contaminação, um ligeiro aumento na sua concentração. Os restantes (P, Ca e Mn) apresentam uma concentração bastante semelhante para ambos os tempos de colheita. Os dados relativos à figura 6.2 encontram-se tabelados no apêndice E (tabela E.1).

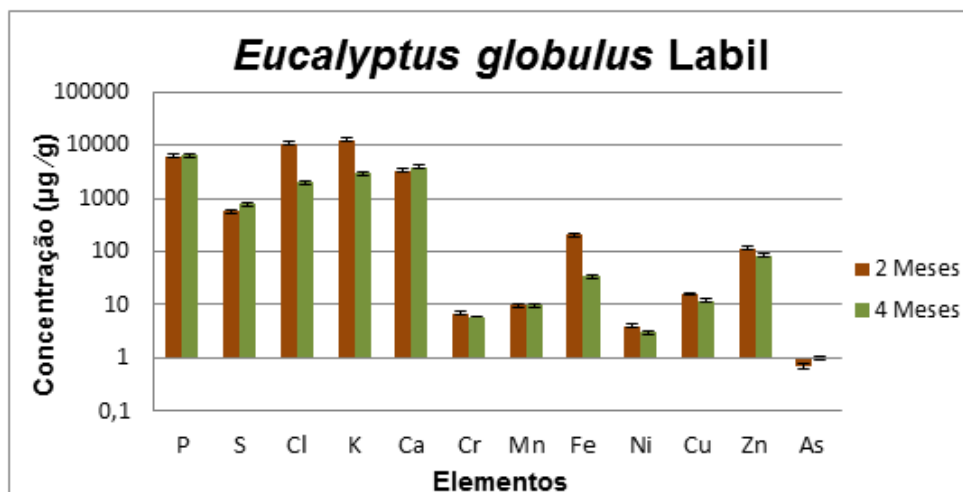


Figura 6.2: Comparação da concentração elementar obtida na raiz da espécie *Eucalyptus globulus* contaminada com 100 µg/g de As, em função dos diferentes tempos de colheita.

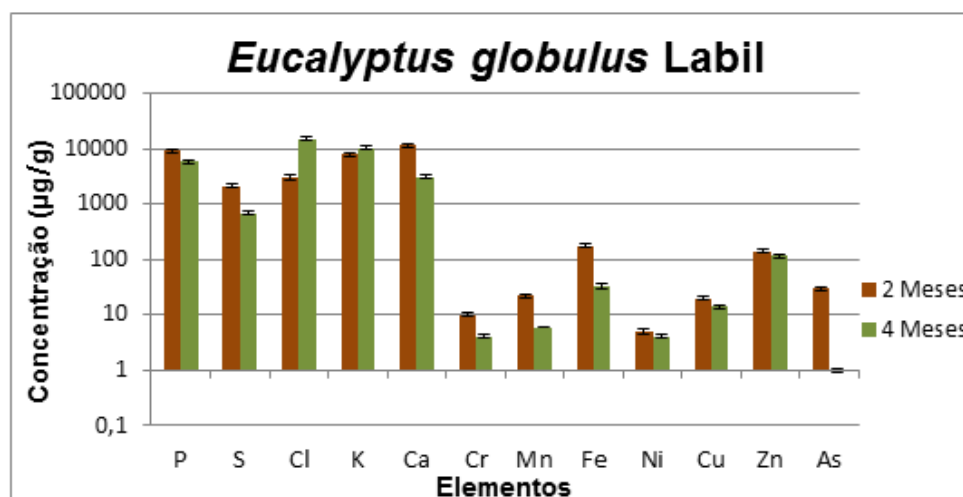


Figura 6.3: Comparação da concentração elementar obtida na raiz da espécie *Eucalyptus globulus* contaminada com 200 µg/g de As, em função dos diferentes tempos de colheita.

A aplicação de uma maior quantidade de As (200 µg/g) no solo da espécie *Eucalyptus globulus* (figura 6.3) permite verificar que a concentração dos elementos na raiz não sofreu alterações bruscas, à exceção do As que, 2 meses após a contaminação do solo, registou uma concentração de  $(30 \pm 2)$  µg/g quando anteriormente, para o mesmo tempo de colheita mas com 100 µg/g de As tinha apenas registado  $(1 \pm 0,08)$  µg/g. No entanto, ao fim de 4 meses a concentração deste elemento é praticamente igual em ambas os casos de contaminação do solo. Os dados relativos à figura 6.3 encontram-se

tabelados no apêndice E (tabela E.2).

Com base nos dados obtidos para a raiz da espécie *Eucalyptus nitens* (figura 6.4), é possível verificar que a diferença nas concentrações dos elementos ao longo do tempo não é muito significativa, à exceção do Ca, Cr e Mn cuja concentração aos 4 meses é superior à concentração registada 2 meses após a contaminação. Em termos das espécies de eucalipto verifica-se, para a mesma quantidade de As aplicado no solo, que a espécie *Eucalyptus globulus* apresenta maiores concentrações de todos os elementos na raiz 2 meses após a contaminação do solo, enquanto que a espécie *Eucalyptus nitens* regista as maiores concentrações na raiz 4 meses após contaminação do mesmo. Os dados relativos à figura 6.4 encontram-se tabelados no apêndice E (tabela E.3).

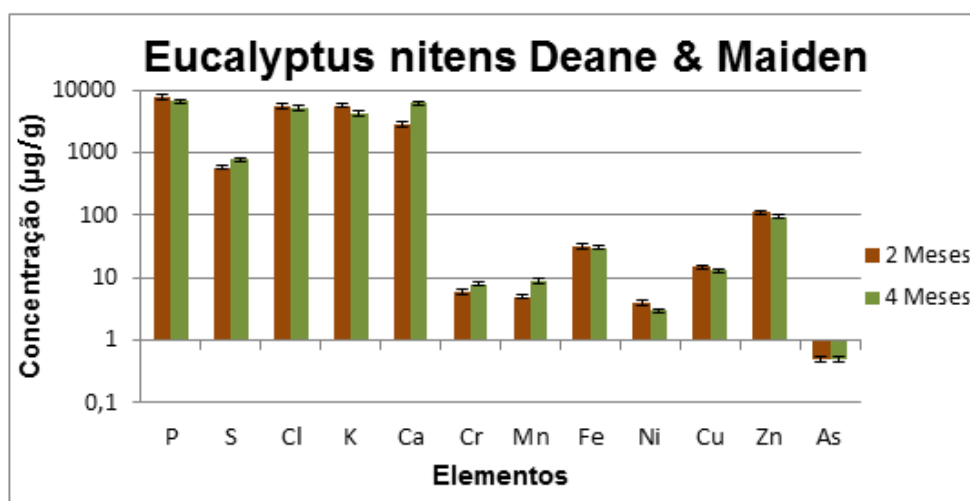


Figura 6.4: Comparação da concentração elementar obtida na raiz da espécie *Eucalyptus nitens* contaminada com 100 µg/g de As, em função dos diferentes tempos de colheita.

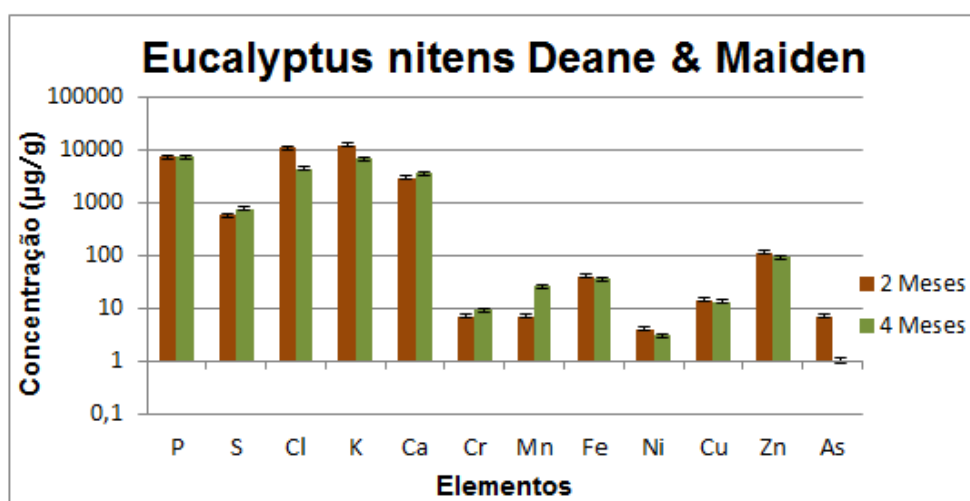


Figura 6.5: Comparação da concentração elementar obtida na raiz da espécie *Eucalyptus nitens* contaminada com 200 µg/g de As, em função dos diferentes tempos de colheita.

A aplicação de uma maior quantidade de As (200 µg/g) no solo da espécie *Eucalyptus nitens* (figura 6.5), permite verificar que a concentração da maioria dos elementos na raiz permaneceu prati-

camente igual ao registado anteriormente com a aplicação de apenas 100  $\mu\text{g/g}$  de As. No entanto, os elementos como o Cl, K, Mn e As registaram um aumento, sendo que este último (As) foi, de todos, aquele cuja concentração foi significativamente superior em ambos os tempos de colheita, face ao processo de contaminação anterior. Os dados relativos à figura 6.5 encontram-se tabelados no apêndice E (tabela E.4).

Relativamente aos dados quantitativos obtidos para a folha da espécie *Eucalyptus nitens*, 2 meses após a contaminação do solo com 200  $\mu\text{g/g}$  de As, podemos verificar que a concentração de As presente nesta estrutura é inferior a qualquer uma das concentrações obtidas para as raízes de ambas as espécies, o que poderá, possivelmente, significar que o As não é translocado em grandes quantidades para a parte aérea, ficando imobilizado nas raízes do eucalipto. Os dados encontram-se tabelados no apêndice E (tabela E.5).

Os dados cedidos pelos colaboradores do DCT da FCT-UNL relativos à concentração de As nas raízes (tabela 6.1), os quais foram obtidos através do sistema portátil de fluorescência de raios-X, modelo Niton Thermo Scientific XLT, são bastante superiores comparativamente aos obtidos através do espectrómetro de  $\mu\text{-EDXRF}$ . Relativamente às folhas do eucalipto (tabela 6.2), ambos os aparelhos de medição, registaram vestígios de As nesta estrutura, apresentando o sistema portátil de XRF valores superiores aos obtidos através da técnica de  $\mu\text{-EDXRF}$ , tal como ocorreu para a raiz.

Tabela 6.1: Concentração de As presente nas raízes da espécie *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens*, ambas contaminadas com 100  $\mu\text{g/g}$  e 200  $\mu\text{g/g}$  de As. Os resultados são apresentados na forma  $\bar{X} \pm \sigma$ .

Espécie (quantidade de As)	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )
<i>globulus</i> (100)	$50 \pm 15$
<i>globulus</i> (200)	$100 \pm 30$
<i>nitens</i> (100)	$90 \pm 30$
<i>nitens</i> (200)	$130 \pm 15$

Tabela 6.2: Concentração de As presente nas folhas da espécie *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens*, resultantes da contaminação com 100  $\mu\text{g/g}$  e 200  $\mu\text{g/g}$  de As. Os resultados são apresentados na forma  $\bar{X} \pm \sigma$ .

Espécie (quantidade de As)	Concentração ( $\mu\text{g/g}$ )
<i>globulus</i> (100)	0
<i>globulus</i> (200)	$3 \pm 2$
<i>nitens</i> (100)	$3 \pm 3$
<i>nitens</i> (200)	$7 \pm 3$



## Capítulo 7

# Conclusões e Perspectivas

O problema das deficiências nutricionais tem sido cada vez mais um tema de preocupação por parte das entidades governamentais, organizações da sociedade civil e setor privado devido aos profundos impactos causados não só na saúde das populações, como também, na economia global.

Os cereais são considerados um excelente veículo para a biofortificação uma vez que estes apresentam custos para o consumidor relativamente baixos, sendo consumidos por uma grande parte da população mundial. Com este trabalho pretendeu-se avaliar a eficácia desta intervenção nutricional utilizando-se, para tal, o trigo. A biofortificação deste cereal revela-se, extremamente, útil na produção de farinha e/ou semolina ricas em nutrientes permitindo, desta forma, minimizar o problema anteriormente referido.

Com base na técnica de  $\mu$ -EDXRF utilizada neste trabalho, foi possível obter informações qualitativas, que resultam das imagens do mapeamento dos grãos de trigo. A partir dessas imagens, podemos observar que os nutrientes, independentemente da espécie do grão de trigo biofortificado, localizam-se, essencialmente, nas diversas camadas que compõem o farelo encontrando-se, também, na região do embrião. Tendo em conta esta localização dos nutrientes torna-se necessária a moagem de todo o grão, incluindo o farelo e o embrião, para a obtenção de semolina (no caso do trigo duro) e farinha (no caso do trigo mole), ambas integrais, as quais são utilizadas na produção de produtos biofortificados (massas alimentícias e pães, por exemplo) destinados ao consumo humano. A escolha do processo tradicional de moagem, no qual apenas se utiliza o endosperma, provoca uma grande perda do conteúdo nutricional deste cereal.

Quando uma planta é submetida a um fator de stress, neste trabalho esse fator foi o aumento da concentração dos nutrientes disponíveis no solo, a planta responde positivamente numa fase inicial. Essa resposta consiste, neste caso, num aumento significativo da concentração de macro e micronutrientes no embrião dos grãos de trigo duro, após a aplicação de 90 mL da solução nutritiva completa. O facto do aumento dos nutrientes se verificar no embrião é extremamente importante uma vez que nesta estrutura do grão encontram-se presentes não só as células germinativas, as quais darão origem a uma nova planta, como também, um forte mecanismo enzimático que, auxiliado pela presença de nutrientes, intervém em atividades metabólicas como a respiração e a fotossíntese.

Relativamente à diferença observada ao nível da concentração dos nutrientes entre os dois tratamentos de adubação, aplicados sobre ambas as espécies de grãos de trigo, é possível verificar

que nos grãos de trigo mole a diferença nas concentrações dos macro e micronutrientes é menor comparativamente à que se observa nos grãos de trigo duro. Este acontecimento pode ser explicado pelo facto de os grãos de trigo mole apresentarem um metabolismo mais estável e organizado uma vez que estes resultam de sementes da 4<sup>o</sup> progenitura. Contrariamente, os grãos de trigo duro, tratando-se da 1<sup>o</sup> geração, apresentam entre os tratamentos de adubação uma desorganização metabólica, que se traduz numa acumulação de nutrientes superior para o tratamento [90], em comparação com o registado para o tratamento [15].

Face aos resultados quantitativos apresentados para a espécie de *Triticum durum* Desf. cv Marialva (trigo duro), os quais foram obtidos através da técnica de AAS, podemos concluir que entre todos os tratamentos de adubação aplicados, o tratamento [30] revela-se como sendo o mais eficaz no processo da biofortificação dos grãos de trigo uma vez que neste tipo de tratamento verificou-se não só uma elevada concentração de macro e micronutrientes nos grãos, como também, uma elevada produção de biomassa, o que traduz o elevado rendimento do grão resultante da aplicação de 30 mL da solução nutritiva completa. Embora para os tratamentos [60] e [90] tenhamos encontrado, em alguns elementos, concentrações mais elevadas do que nos outros tratamentos, do ponto de vista da produção de biomassa estes registaram um baixo rendimento.

A presença de elevadas concentrações de Zn na parte aérea da planta de trigo duro, ao contrário das baixas concentrações dos micronutrientes como o Fe e o Cu registadas para essa estrutura, permitem-nos concluir que o Zn tem uma interferência significativa nos mecanismos de absorção e translocação destes elementos (Fe e Cu) para a parte aérea, sendo que a interferência é maior no caso do Fe para o qual se regista uma diminuição bastante acentuada da sua concentração ao longo da planta. Esta interferência deve ser tida em consideração na estratégia de enriquecimento nutricional dos alimentos, procedendo-se ao ajuste da razão Fe/Zn.

Uma das características associadas ao sucesso da biofortificação está relacionada com o aumento da quantidade de micronutrientes nas zonas comestíveis da planta biofortificada. No entanto, para garantir o total sucesso desta estratégia nutricional é necessário o estudo da biodisponibilidade dos micronutrientes por parte do organismo humano, estudo esse que deverá ser realizado num trabalho posterior.

Relativamente aos valores das concentrações obtidos para as raízes e para as folhas do eucalipto, podemos concluir que o facto das folhas serem muito finas e apresentarem uma baixa densidade faz com que o volume irradiado seja pequeno e dentro desse volume existam poucos átomos. Em relação às raízes, apesar destas estruturas apresentarem uma densidade superior, as concentrações elementares obtidas para o As são relativamente baixas. Os limites de detecção da técnica para este elemento não são muito elevados, contudo encontram-se na ordem dos valores medidos, o que quer dizer que na realidade não existe uma grande quantidade de As nem nas folhas nem nas raízes do eucalipto. Num trabalho futuro seria interessante moer cada uma das estruturas do eucalipto (raízes e folhas), de forma a construir uma pastilha compacta para posterior análise através da técnica de EDXRF com geometria tri-axial, cujos limites de detecção permitem concentrações inferiores às detetadas com a técnica  $\mu$ -EDXRF.

# Bibliografia

- [1] Institute of Medicine, “Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc,” 2001. Washington, DC.
- [2] Project Healthy Children, “Fortification Overview,” 2012. [Internet] Disponível em: <http://projecthealthychildren.org/why-food-fortification/fortification-overview/>. Data de Acesso: 2015-01-16.
- [3] B. Curtis; S. Rajaram; H.G. Macpherson, “Bread Wheat - Improvement and Production,” 2002. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- [4] J. Dwyer; C. Woteki; R. Bailey; P. Britten; A. Carriquiry; P. C. Gaine; D. Miller, Dennis; A. Moshfegh; M.M. Murphy; M. Smith Edge, “Fortification: New Findings and Implications,” *Nutr. Rev.*, vol. 72, no. 2, pp. 127–141, 2014.
- [5] Direcção de Relações Corporativas da Nestlé Portugal S.A., “Necessidades Nutricionais e Dietas de Qualidade-Relatório 2008 sobre a Criação de Valor Partilhado.” 2009.
- [6] L. A. Rowe, “A Knowledge-to-Action Approach to Food Fortification: Guiding Principles for the Design of Fortification Programs as a Means of Effectively Addressing Micronutrient Malnutrition,” *Health (Irvine, Calif.)*, vol. 04, no. 10, pp. 904–909, 2012.
- [7] United Nations Children’s Fund (UNICEF), “Improving Child Nutrition: The Achievable Imperative for Global Progress,” pp. 1–131, 2013.
- [8] Institut National d’Études Démographiques (INED), “The Population of the World (2005),” *Popul. Soc.*, 2005.
- [9] J. V. Meenakshi, “Best Practice Paper, Cost-Effectiveness of Biofortification,” pp. 1–21, 2009. Copenhagen Consensus Center.
- [10] Direcção-Geral da Saúde, “Portal da Saúde - Direcção-Geral da Saúde,” 2013. [Internet] Disponível em: <http://www.portaldasaude.pt/portal/conteudos/a+saude+em+portugal/ministerio/servicos/dgs.htm>. Data de Acesso: 2015-01-28.
- [11] Direcção-Geral da Saúde, “Portugal: Alimentação Saudável em Números-2013,” 2013.
- [12] A. Guerra; C. Rêgo; D. Silva; G. Ferreira; H. Mansilha; H. Antunes; R. Ferreira, “Alimentação e Nutrição do Lactente,” *Acta Pediátrica Port.*, vol. 43, 2012.

- [13] T. Almeida, “Estudo da Distribuição de Elementos Vestigiais em Tecidos Humanos Saudáveis e com Carcinoma por Espectrometria de Raios-X,” 2007. Tese de Doutorado, Universidade de Lisboa-Faculdade de Ciências.
- [14] UNICEF, “The Adolescent Girls Anaemia Control Programme,” 2011. [Internet] Disponível em: [http://www.unicef.org/india/14.\\_Adolescent\\_Anaemia\\_Control\\_Programme.pdf](http://www.unicef.org/india/14._Adolescent_Anaemia_Control_Programme.pdf).
- [15] Nestlé S.A., “Nestlé and Fortified Milk Products. Country: Global,” 2012.
- [16] Nestlé S.A., “Micronutrient Fortification of Maggi Products. Country: Nigeria,” pp. 1–2, 2012. [Internet] Disponível em: <http://www.nestle.com/csv/casestudies/allcasestudies/micronutrientfortificationofmaggi>.
- [17] Australian National Health and Medical Research Council, “Iron: Recommendations by Life Stage and Gender,” 2005.
- [18] U.S.National Library of Medicine, “Zinc in Diet,” 2013. [Internet] Disponível em: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/002416.htm>. Data de Acesso: 2015-09-03.
- [19] L. Fernández, “O que é o Codex Alimentarius?,” 2004. [Internet] Disponível em: <http://www.eufic.org/article/pt/artid/O-que-Codex-Alimentarius/>. Data de Acesso: 2015-01-29.
- [20] Parlamento Europeu e do Conselho, “REGULAMENTO (CE) N.º 1925/ 2006 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 20 de Dezembro de 2006 relativo à adição de vitaminas, minerais e determinadas outras substâncias aos alimentos,” 2006.
- [21] Project Healthy Children, “Importance of Micronutrients,” 2012. [Internet] Disponível em: <http://projecthealthychildren.org/why-food-fortification/micronutrients/>. Data de Acesso: 2015-01-15.
- [22] International Center for Tropical Agriculture (CIAT) and International Food Policy Research Institute (IFPRI), “Biofortified Crops For Improved Human Nutrition.” 2002.
- [23] HarvestPlus e Instituto Internacional de Pesquisa Políticas Alimentares (IFPRI ), “Melhores Colheitas, Melhor Nutrição,” 2012. Washington, DC.
- [24] J. Rosado; K.L. Hambidge; L. V. Miller, Leland; O. P. Garcia; K. Gonzalez; J. Conde; C. Hotz; W. Pfeiffer; I. Ortiz-monasterio; N.F. Krebs, “The Quantity of Zinc Absorbed from Wheat in Adult Women Is Enhanced by Biofortification.” 2009.
- [25] Dokello, “Mapping for Investments in Biofortification: HarvestPlus Launches Interactive New Tool,” [Internet] Disponível em: <http://www.harvestplus.org/content/mapping-investments-biofortification>. Data de Acesso: 2015-01-29.
- [26] A. Monho, “Determinação do valor tecnológico e de utilização de vários tipos de misturas de farinha de trigo mole e sêmola de trigo duro para o fabrico de pão tradicional,” pp. 1–110, 2013. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- [27] Associação Portuguesa dos Nutricionistas, Massas Alimentícias: Uma Abordagem Técnica e Científica. APN, nº35 ed., 2014.

- [28] I. M. Pataco; M. P. Mourinho; K. Oliveira; C. Santos; J. Pelica; I. P. Pais; J. C. Ramalho; A. E. Leitão; P. S. Campos; F. C. Lidon; F. H. Reboredo; M. F. Pessoa, "Durum Wheat (*Triticum durum*) Biofortification in Iron and Definition of Quality Parameters for the Industrial Production of Pasta - A Review," *Emirates J. Food Agric.*, vol. 27, no. 3, pp. 242–249, 2015.
- [29] Instituto Nacional de Estatística I.P., "Estatísticas Agrícolas 2013," pp. 1–168, 2014. Lisboa.
- [30] C. Gouveia; T. Trigo, "Influence of Climate Variability on Wheat Production in Portugal." Instituto Politécnico de Setúbal-Escola Superior de Tecnologia de Setúbal, 2006.
- [31] J. Coutinho; B. Maças; A. S. Almeida; C. Gomes; R. Costa; N. Pinheiro; J. Coco; A. Costa, "Melhoramento Genético de Cereais de Outono/Inverno em Portugal," 2014.
- [32] M. P. Mourinho; I. M. Pataco; K. Oliveira; C. Santos; J. Pelica; J. Ramalho; A. Leitão; I. Pais; P. S. Campos; F. Lidon; F. Reboredo; M. Pessoa, "Zinc Biofortification in *Triticum aestivum* L. - From Grains to Bakery products," *Emirates J. Food Agric.*, vol. 27, no. 2, pp. 164–170, 2015.
- [33] A. Monho, "Determinação do valor tecnológico e de utilização de vários tipos de misturas de farinha de trigo mole e sêmola de trigo duro para o fabrico de pão tradicional," pp. 1–110, 2013. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- [34] Botanical, "Properties of Wheat Germ," [Internet] Disponível em: <http://www.botanical-online.com/english/wheatgerm.htm>. Data de Acesso: 2015-03-20.
- [35] Botanical, "Properties of Wheat," [Internet] Disponível em: <http://www.botanical-online.com/english/wheat.htm>. Data de Acesso: 2015-03-20.
- [36] Encyclopaedia Britannica Online, "Cereal Processing and Utilization," 1996. [Internet] Disponível em: <http://www.britannica.com/topic/cereal-processing>. Data de Acesso: 2015-09-20.
- [37] S. P. Singh; K. Vogel-Mikuš; I. Arčon; P. Vavpetič; L. Jeromel; P. Pelicon; J. Kumar; R. Tuli, "Pattern of Iron Distribution in Maternal and Filial Tissues in Wheat Grains With Contrasting Levels of Iron," *J. Exp. Bot.*, vol. 64, 2013.
- [38] D. Guimarães, "Measurement of Lead Concentration in Biological Tissues by Atomic Spectroscopy Techniques," no. December, 2011. Tese de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa-Faculdade de Ciências e Tecnologia.
- [39] S. Svanberg, *Atomic and Molecular Spectroscopy*. Springer, 4 ed., 2003.
- [40] R. Hart, "Hardware Hacking," 2008. [Internet] Disponível em: <http://www.hardhack.org.au/book/export/html/76>. Data de Acesso: 2015-08-01.
- [41] J. Deus; M. Pimenta; A. Noronha; T. Peña; P. Brogueira, *Introdução à física*. McGraw-Hill, 2ª ed., 2000.
- [42] J. W. Kane and M. M. Sternheim, *Physics S.I Version*. Massachusetts: John Wiley & Sons, Inc, 1980.
- [43] A. Moreno, "Non-Destructive Characterization of Artworks in Paper Support Using Spectroscopic Techniques," 2013. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa-Faculdade de Ciências.

- [44] Toshiyouri, “Fluorescence and Auger electron yields as a function of atomic number for K shell vacancies.” 2015. [Internet] Disponível em: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Auger\\_xray\\_wiki\\_in\\_png\\_format.png?uselang=pt](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Auger_xray_wiki_in_png_format.png?uselang=pt). Data de Acesso: 2015-09-13.
- [45] C. Nave, “HyperPhysics,” 2014. [Internet] Disponível em: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/quantum/xrayc.html>. Data de Acesso: 2015-08-02.
- [46] N. Paltridge; L. J. Palmer; P. J. Milham; G. E. Guild; J. Stangoulis, “Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence Analysis of Zinc and Iron Concentration in Rice and Pearl Millet Grain,” *Plant Soil*, vol. 361, no. 1-2, pp. 251–260, 2012.
- [47] Bruker AXS Microanalysis GmbH, “Physical Principles of Micro-X-ray Fluorescence,” 2009.
- [48] XOS, “Energy Dispersive X-ray Fluorescence (EDXRF),” [Internet] Disponível em: <https://xos.com/technologies/xrf/energy-dispersive-x-ray-fluorescence-ed-xrf/>. Data de Acesso: 2015-08-03 ,.
- [49] A. K. Gupta; M. Gupta, “Synthesis and Surface engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 18, 2004.
- [50] M. Jackson, *Soil Chemical Analysis*. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall Inc, 1 ed., 1958.
- [51] L. Lin; P. D. Sherman, “Cleaning Data the Chauvenet Way,” in *SESUG 2007 Proc. SouthEast SAS Users Gr.*, (Hilton Head), pp. 1–11, 2007.
- [52] A. Kabata-Pendias, *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press, 4 ed., 2011.
- [53] M. A. D. C. Ribeiro, “Contaminação Do Solo Por Metais,” pp. 1–249, 2013. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- [54] M. L. Dinis, “Modelos Fenomenológicos de Distribuição Intercompartimental de Substâncias Radioativas,” vol. II, 2007. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.
- [55] H. Sarma, “Metal Hyperaccumulation in Plants: A Review Focusing on Phytoremediation Technology,” 2011.
- [56] F. Lamego; R. Vidal, “Fitorremediação: Plantas Como Agentes De Despoluição?,” *Pestic. Rev. Ecotoxicologia e Meio Ambient.*, vol. 17, pp. 9–18, 2007.
- [57] L. Nalon, “Potencial Do Eucalipto Na Fitorremediação De Um Solo Contaminado Por Chumbo,” pp. 1–94, 2008. Tese de Mestrado, Universidade Estadual Paulista-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
- [58] D. Buosi; J. M. Felfili, “Recuperação de Áreas Contaminadas por Pesticidas Organoclorados na Cidade dos Meninos, Município de Duque de Caxias, RJ,” *Rev. Árvore*, vol. 28, pp. 465–470, 2004.
- [59] K. Kühn, “From Brownfields to Greenfields: A Field Guide to Phytoremediation,” 2010. [Internet] Disponível em: <http://urbanomnibus.net/2010/11/from-brownfields-to-greenfields-a-field-guide-to-phytoremediation/>. Data de Acesso: 2015-02-05.

- 
- [60] J. Camargo, “Eucaliptugal, O Ecocídio da Floresta Nacional,” Visão Verde, 2013.
- [61] M. Abreu; E. C. Santos; M. C. Magalhães; C. Nabais, “Fases Portadoras do Arsénio em Solos da Área Mineira de São Domingos e em Solos Não Contaminados do Pomarão e Serra do Caldeirão,” Rev. Ciências Agrárias, 2009.





# Apêndice A

## Vitaminais e Minerais

Tabela A.1: Minerais e vitaminas utilizadas na fortificação dos alimentos, segundo o artigo 3º do capítulo II da Ref. [20].

Minerais	Vitaminais
Cálcio	Vitamina A
Magnésio	Vitamina D
Ferro	Vitamina E
Cobre	Vitamina K
Iodo	Vitamina B1
Zinco	Vitamina B2
Manganês	Niacina
Sódio	Ácido Pantoténico
Potássio	Vitamina B6
Selênio	Ácido Fólico
Crômio	Vitamina B12
Molibdênio	Biotina
Fluoreto	Vitamina C
Cloreto	
Fósforo	



## Apêndice B

### Mapeamentos do Grão de Trigo

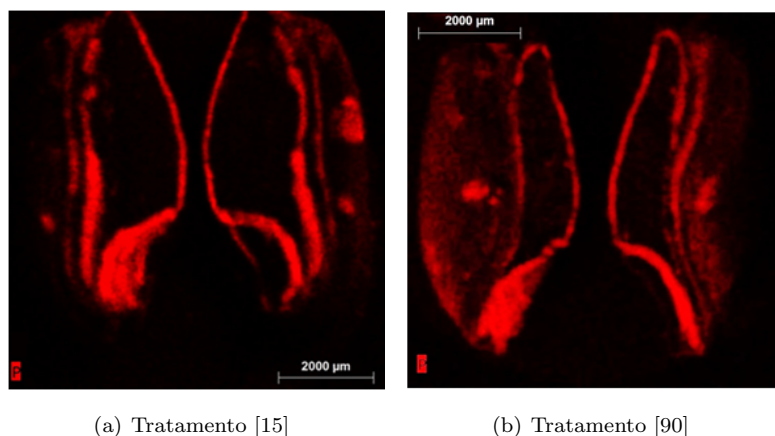


Figura B.1: Imagens da distribuição do P no grão de *Triticum durum* Desf. (trigo duro) para os tratamentos de adubação com 15 mL (a) e 90 mL (b) da solução nutritiva completa.

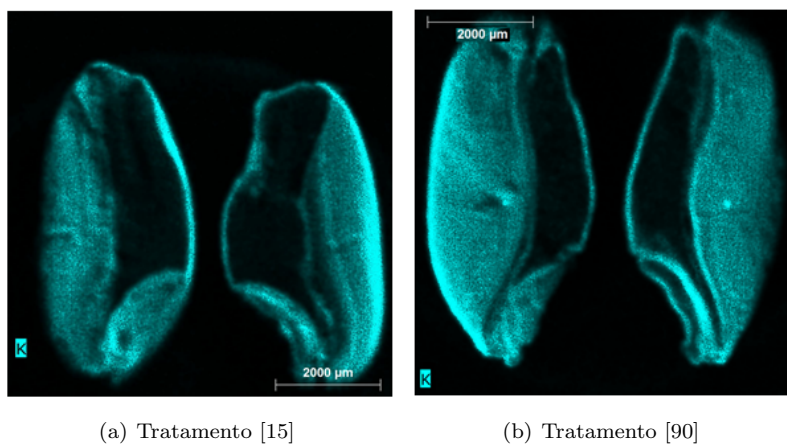


Figura B.2: Imagens da distribuição do K no grão de *Triticum durum* Desf. (trigo duro) para os tratamentos de adubação com 15 mL (a) e 90 mL (b) da solução nutritiva completa.

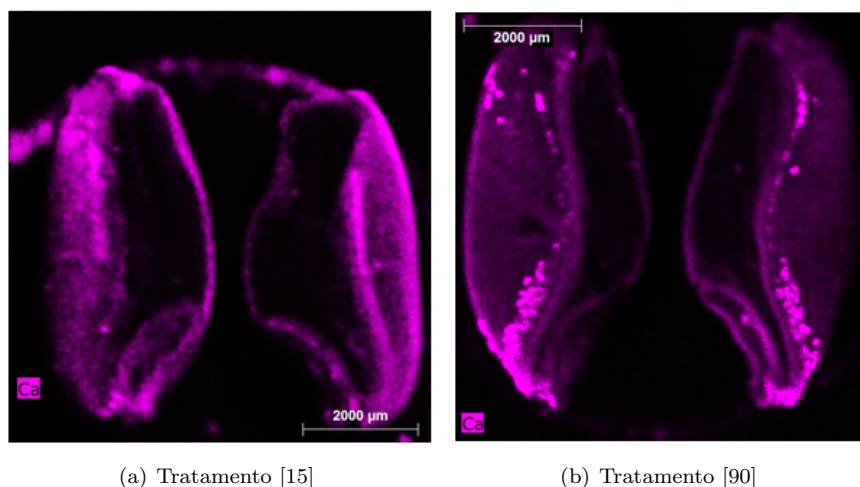


Figura B.3: Imagens da distribuição do Ca no grão de *Triticum durum* Desf. (trigo duro) para os tratamentos de adubação com 15 mL (a) e 90 mL (b) da solução nutritiva completa.

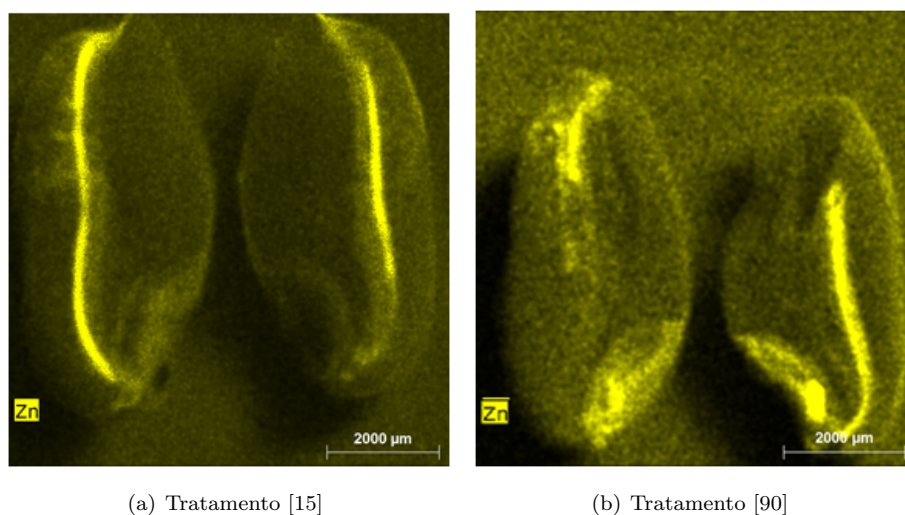
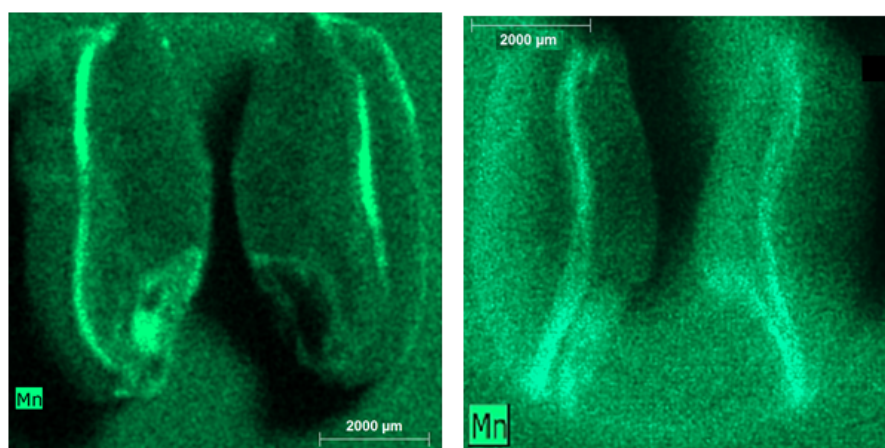


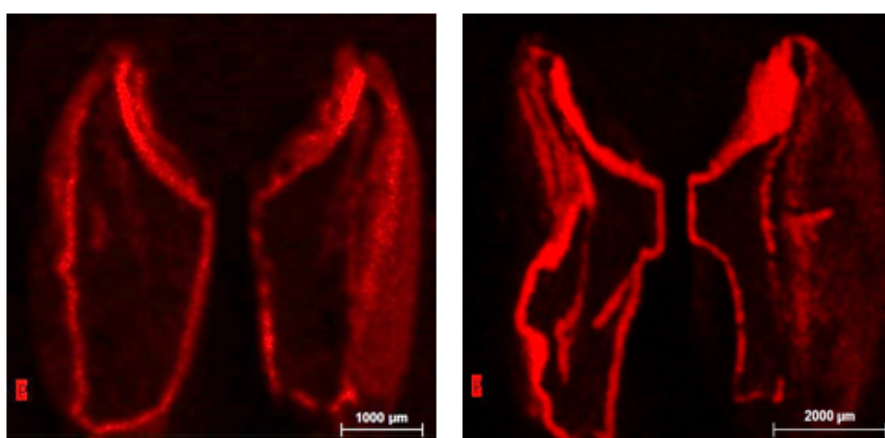
Figura B.4: Imagens da distribuição do Zn no grão de *Triticum durum* Desf. (trigo duro) para os tratamentos de adubação com 15 mL (a) e 90 mL (b) da solução nutritiva completa.



(a) Tratamento [15]

(b) Tratamento [90]

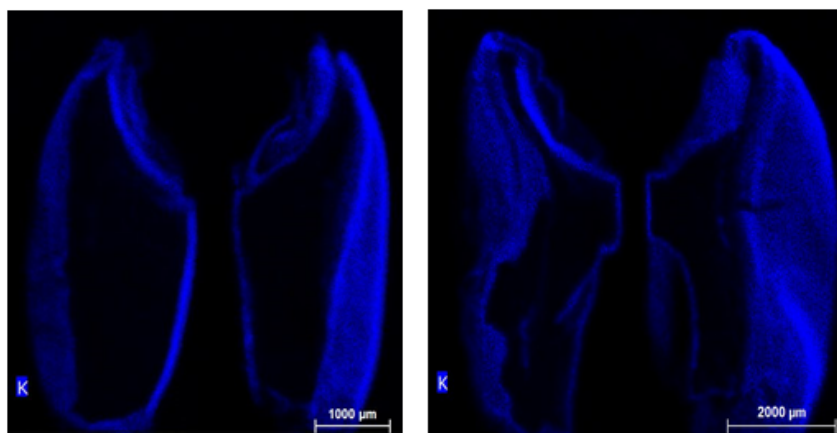
Figura B.5: Imagens da distribuição do Mn no grão de *Triticum durum* Desf. (trigo duro) para os tratamentos de adubação com 15 mL (a) e 90 mL (b) da solução nutritiva completa.



(a) Sementes de Controle

(b) Sementes da 4° progenitura

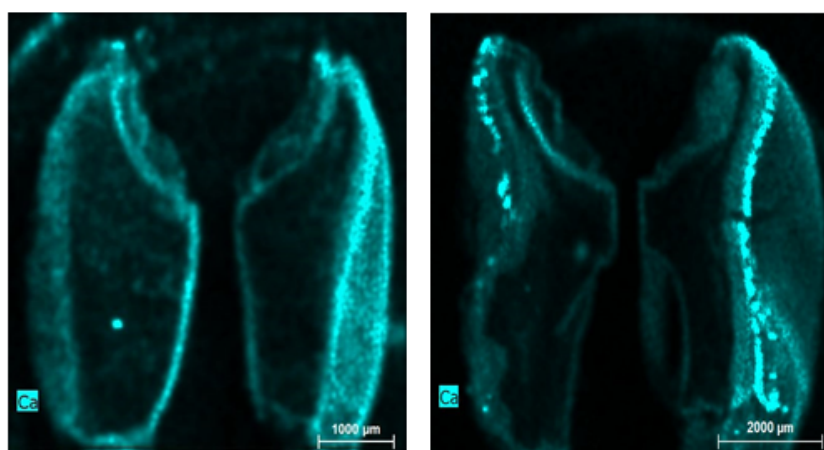
Figura B.6: Imagens da distribuição do P no grão de *Triticum aestivum* L. (trigo mole) proveniente de sementes de controle (a) e sementes da 4° progenitura (b).



(a) Sementes de Controlo

(b) Sementes da 4º progenitura

Figura B.7: Imagens da distribuição do K no grão de *Triticum aestivum* L. (trigo mole) proveniente de sementes de controlo (a) e sementes da 4º progenitura (b).



(a) Sementes de Controlo

(b) Sementes da 4º progenitura

Figura B.8: Imagens da distribuição do Ca no grão de *Triticum aestivum* L. (trigo mole) proveniente de sementes de controlo (a) e sementes da 4º progenitura (b).

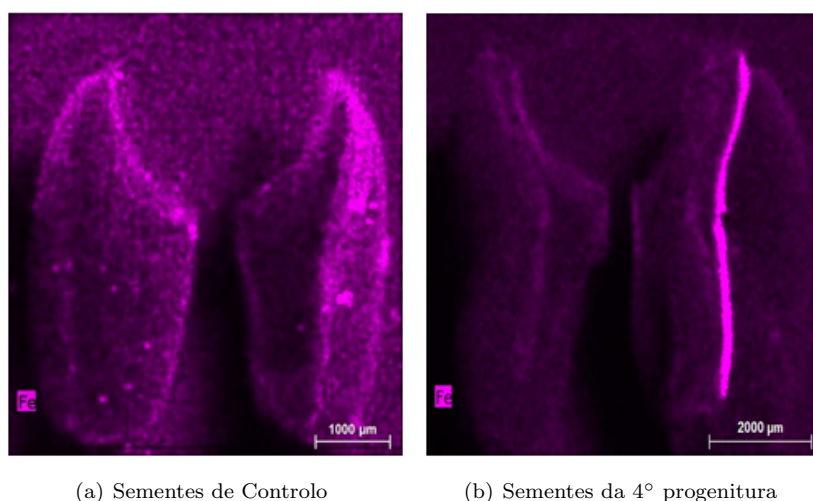


Figura B.9: Imagens da distribuição do Fe no grão de *Triticum aestivum* L. (trigo mole) proveniente de sementes de controlo (a) e sementes da 4º progenitura (b).

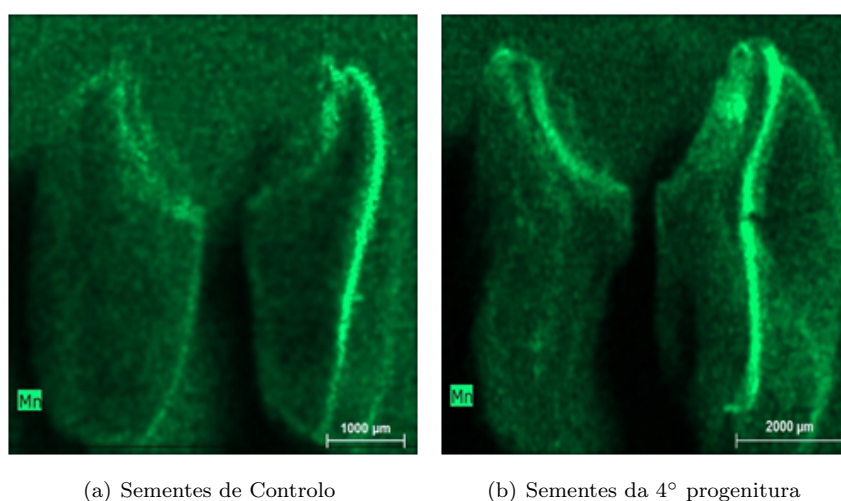


Figura B.10: Imagens da distribuição do Mn no grão de *Triticum aestivum* L. (trigo mole) proveniente de sementes de controlo (a) e sementes da 4º progenitura (b).





# Apêndice C

## Dados Associados à Técnica de $\mu$ -EDXRF: Trigo

Tabela C.1: Dados relativos à concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação no farelo do *Triticum durum* Desf. (trigo duro).

Trigo Duro Farelo	Tratamento [15] mL ( $\mu\text{g/g}$ )	Tratamento [90] mL ( $\mu\text{g/g}$ )
Si	800 $\pm$ 400	600 $\pm$ 300
P	7000 $\pm$ 4000	6500 $\pm$ 1200
S	2900 $\pm$ 1400	2100 $\pm$ 400
Cl	2700 $\pm$ 1400	770 $\pm$ 120
K	34000 $\pm$ 17000	28000 $\pm$ 6000
Ca	3300 $\pm$ 1600	6000 $\pm$ 3000
Ti	10 $\pm$ 6	25 $\pm$ 10
Mn	90 $\pm$ 40	150 $\pm$ 50
Fe	130 $\pm$ 60	80 $\pm$ 30
Cu	15 $\pm$ 5	14 $\pm$ 3
Zn	100 $\pm$ 40	80 $\pm$ 20

Tabela C.2: Dados relativos à concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação no escutelo do embrião de *Triticum durum* Desf. (trigo duro).

Trigo Duro	Tratamento [15] mL	Tratamento [90] mL
Escutelo	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )
Al	$900 \pm 170$	$800 \pm 300$
Si	$900 \pm 400$	$900 \pm 400$
P	$1200 \pm 600$	$18000 \pm 9000$
S	$4400 \pm 1800$	$3000 \pm 1200$
Cl	$600 \pm 300$	$700 \pm 300$
K	$240 \pm 110$	$16500 \pm 7300$
Ca	$1300 \pm 7000$	$4000 \pm 1900$
Ti	$100 \pm 40$	$30 \pm 20$
Mn	$30 \pm 2$	$200 \pm 100$
Fe	$40 \pm 15$	$240 \pm 110$
Cu	$10 \pm 2$	$20 \pm 8$
Zn	$60 \pm 20$	$180 \pm 90$

Tabela C.3: Dados relativos à concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação na radícula do embrião de *Triticum durum* Desf. (trigo duro).

Trigo Duro	Tratamento [15] mL	Tratamento [90] mL
Radícula	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )
Al	$1000 \pm 300$	—
Si	$640 \pm 180$	$280 \pm 80$
P	$1300 \pm 500$	$19000 \pm 10000$
S	$4300 \pm 300$	$3500 \pm 1300$
Cl	$440 \pm 70$	$900 \pm 300$
K	$350 \pm 150$	$14000 \pm 6000$
Ca	$1400 \pm 700$	$3600 \pm 1600$
Ti	$80 \pm 20$	$40 \pm 30$
Mn	$30 \pm 3$	$400 \pm 150$
Fe	$40 \pm 10$	$300 \pm 90$
Cu	$10 \pm 2$	$20 \pm 6$
Zn	$70 \pm 12$	$120 \pm 40$

Tabela C.4: Dados relativos à concentração elementar obtida para os dois tratamentos de adubação na nervura de *Triticum durum* Desf. (trigo duro).

Trigo Duro Aleurona	Tratamento [15] mL ( $\mu\text{g/g}$ )	Tratamento [90] mL ( $\mu\text{g/g}$ )
Al	$1200 \pm 300$	—
Si	$440 \pm 160$	$400 \pm 200$
P	$1200 \pm 6000$	$5500 \pm 3000$
S	$3900 \pm 1600$	$3800 \pm 1500$
Cl	$900 \pm 400$	$900 \pm 400$
K	$17000 \pm 9000$	$16000 \pm 5000$
Ca	$4000 \pm 1900$	$6000 \pm 3000$
Ti	$40 \pm 30$	$40 \pm 30$
Mn	$50 \pm 20$	$900 \pm 500$
Fe	$900 \pm 500$	$900 \pm 500$
Cu	$30 \pm 15$	$30 \pm 10$
Zn	$300 \pm 200$	$180 \pm 70$

Tabela C.5: Dados relativos à concentração elementar obtida no farelo para os grãos de *Triticum aestivum* L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações.

Trigo Mole Farelo	Sementes Controlo ( $\mu\text{g/g}$ )	Sementes da 4 <sup>o</sup> Progenitura ( $\mu\text{g/g}$ )
Al	—	$800 \pm 300$
Si	$280 \pm 60$	$700 \pm 70$
P	$9000 \pm 5000$	$7000 \pm 4000$
S	$1700 \pm 600$	$2900 \pm 1500$
Cl	$2600 \pm 1200$	$900 \pm 400$
K	$27000 \pm 9000$	$22000 \pm 10000$
Ca	$2100 \pm 900$	$2000 \pm 900$
Ti	$25 \pm 7$	$30 \pm 15$
Mn	$110 \pm 30$	$100 \pm 40$
Fe	$90 \pm 30$	$70 \pm 30$
Cu	$20 \pm 5$	$15 \pm 3$
Zn	$90 \pm 20$	$100 \pm 30$

Tabela C.6: Dados relativos à concentração elementar obtida no escutelo para os grãos de *Triticum aestivum* L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações.

Trigo Mole Escutelo	Sementes Controlo ( $\mu\text{g/g}$ )	Sementes da 4 <sup>o</sup> Progenitura ( $\mu\text{g/g}$ )
Al	—	$1100 \pm 180$
Si	$190 \pm 40$	$360 \pm 170$
P	$32000 \pm 16000$	$20000 \pm 10000$
S	$3000 \pm 1000$	$6000 \pm 3000$
Cl	$1300 \pm 600$	$580 \pm 150$
K	$15000 \pm 7000$	$9000 \pm 5000$
Ca	$500 \pm 300$	$1900 \pm 1000$
Ti	$30 \pm 15$	$30 \pm 15$
Mn	$110 \pm 50$	$120 \pm 60$
Fe	$170 \pm 80$	$170 \pm 90$
Cu	$30 \pm 10$	$40 \pm 20$
Zn	$120 \pm 40$	$320 \pm 170$

Tabela C.7: Dados relativos à concentração elementar obtida na radícula para os grãos de *Triticum aestivum* L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações.

Trigo Mole Radícula	Sementes Controlo ( $\mu\text{g/g}$ )	Sementes da 4 <sup>o</sup> Progenitura ( $\mu\text{g/g}$ )
Al	—	$1000 \pm 300$
Si	$420 \pm 130$	$320 \pm 110$
P	$37000 \pm 19000$	$23000 \pm 15000$
S	$3200 \pm 1100$	$3700 \pm 1400$
Cl	$1900 \pm 900$	$600 \pm 300$
K	$20000 \pm 10000$	$15000 \pm 7000$
Ca	$700 \pm 400$	$2000 \pm 1000$
Ti	$20 \pm 10$	$40 \pm 3$
Mn	$310 \pm 160$	$190 \pm 90$
Fe	$90 \pm 40$	$130 \pm 70$
Cu	$30 \pm 15$	$30 \pm 10$
Zn	$140 \pm 50$	$130 \pm 50$

Tabela C.8: Dados relativos à concentração elementar obtida na nervura para os grãos de *Triticum aestivum* L. (trigo mole), provenientes de sementes de diferentes gerações.

Trigo Mole Aleurona	Sementes Controlo ( $\mu\text{g/g}$ )	Sementes da 4 <sup>o</sup> Progenitura ( $\mu\text{g/g}$ )
Si	$1160 \pm 600$	$650 \pm 400$
P	$6890 \pm 4000$	$16300 \pm 6000$
S	$2930 \pm 700$	$2630 \pm 900$
Cl	$1770 \pm 700$	$700 \pm 300$
K	$21200 \pm 9000$	$21000 \pm 8000$
Ca	$3770 \pm 1700$	$3740 \pm 1500$
Ti	$25 \pm 10$	$20 \pm 5$
Mn	$745 \pm 400$	$680 \pm 300$
Fe	$250 \pm 100$	$130 \pm 50$
Cu	$40 \pm 15$	$20 \pm 5$
Zn	$280 \pm 100$	$1270 \pm 700$



# Apêndice D

## Dados Associados à Técnica de Espectrofotometria de Absorção Atômica

Tabela D.1: Concentração média dos micronutrientes Fe, Cu, Mn e Zn na raiz da planta de trigo duro, submetida a quatro tratamentos de adubação, em diferentes tempos de colheita.

Colheita	[15] mL	[30] mL	[60] mL	[90] mL
Fe ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	150 $\pm$ 30	—	—	—
t2	50,000 $\pm$ 0,010	120 $\pm$ 30	80,000 $\pm$ 0,010	120 $\pm$ 40
t3	40 $\pm$ 12	80 $\pm$ 11	150 $\pm$ 30	430 $\pm$ 50
t4	60 $\pm$ 8	70 $\pm$ 15	380 $\pm$ 130	340 $\pm$ 50
Cu ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	16,0 $\pm$ 0,3	—	—	—
t2	17 $\pm$ 7	20 $\pm$ 5	40 $\pm$ 10	36 $\pm$ 16
t3	33,0 $\pm$ 1,9	30 $\pm$ 6	53 $\pm$ 4	45,0 $\pm$ 1,2
t4	38 $\pm$ 8	33 $\pm$ 3	44 $\pm$ 7	43 $\pm$ 7
Mn ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	29,00 $\pm$ 1,09	—	—	—
t2	20,00 $\pm$ 1,20	28,00 $\pm$ 1,00	132,00 $\pm$ 1,00	100,00 $\pm$ 2,00
t3	24,00 $\pm$ 1,10	24,00 $\pm$ 0,60	69,00 $\pm$ 1,20	67,00 $\pm$ 4,00
t4	18,00 $\pm$ 1,20	23,00 $\pm$ 2,00	62,00 $\pm$ 1,80	175,00 $\pm$ 0,90
Zn ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	177,00 $\pm$ 5,00	—	—	—
t2	108,00 $\pm$ 30,00	107,00 $\pm$ 19,00	91,00 $\pm$ 30,00	65,00 $\pm$ 12,00
t3	220,00 $\pm$ 30,00	140,00 $\pm$ 16,00	120,00 $\pm$ 7,00	92,00 $\pm$ 2,00
t4	185,00 $\pm$ 8,00	54,00 $\pm$ 3,00	63,00 $\pm$ 7,00	65,00 $\pm$ 4,00

Tabela D.2: Concentração média dos micronutrientes Fe, Cu, Mn e Zn na parte aérea da planta de trigo duro, submetida a quatro tratamentos de adubação, em função dos diferentes tempos de colheita.

Colheita	[15] mL	[30] mL	[60] mL	[90] mL
Fe ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	45,0 $\pm$ 0,6	—	—	—
t2	45 $\pm$ 2	31,0 $\pm$ 1,5	37,0 $\pm$ 0,4	47,0 $\pm$ 0,4
t3	31 $\pm$ 4	42 $\pm$ 3	41 $\pm$ 3	42 $\pm$ 1
t4	70 $\pm$ 13	25,0 $\pm$ 1,5	28,00 $\pm$ 0,08	30,0 $\pm$ 0,5
Cu ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	9 $\pm$ 1	—	—	—
t2	11,0 $\pm$ 0,5	14 $\pm$ 4	25 $\pm$ 3	11,0 $\pm$ 1,5
t3	11 $\pm$ 4	10,0 $\pm$ 1,2	16 $\pm$ 4	8,00 $\pm$ 0,16
t4	9,0 $\pm$ 1,3	12,0 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 1,5	12,0 $\pm$ 1,8
Mn ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	28,0 $\pm$ 0,3	—	—	—
t2	15,0 $\pm$ 0,4	28,0 $\pm$ 0,4	125 $\pm$ 1	170,0 $\pm$ 1,3
t3	12,0 $\pm$ 0,4	28,0 $\pm$ 1,2	180 $\pm$ 10	340 $\pm$ 9
t4	21,0 $\pm$ 0,7	48,0 $\pm$ 1,8	185,0 $\pm$ 1,5	150,0 $\pm$ 1,1
Zn ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	65 $\pm$ 1	—	—	—
t2	160 $\pm$ 18	150 $\pm$ 6	100 $\pm$ 12	95 $\pm$ 21
t3	273 $\pm$ 13	180 $\pm$ 2	140 $\pm$ 10	100 $\pm$ 5
t4	210 $\pm$ 6	185 $\pm$ 20	280 $\pm$ 10	135 $\pm$ 2



Tabela D.3: Concentração média dos macronutrientes Ca, K, Mg e P na raiz da planta de trigo duro, submetida a quatro tratamentos de adubação, em função dos diferentes tempos de colheita.

Colheita	[15] mL	[30] mL	[60] mL	[90] mL
Ca ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	4300 $\pm$ 700	—	—	—
t2	2200 $\pm$ 600	8000 $\pm$ 3000	6000 $\pm$ 3000	6000 $\pm$ 3000
t3	4500 $\pm$ 500	12000 $\pm$ 300	10000 $\pm$ 2000	17200 $\pm$ 1200
t4	8500 $\pm$ 1300	10700 $\pm$ 1300	21000 $\pm$ 2000	27000 $\pm$ 2000
K ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	41900 $\pm$ 700	—	—	—
t2	24000 $\pm$ 9000	41000 $\pm$ 8000	32000 $\pm$ 11000	34000 $\pm$ 8000
t3	68000 $\pm$ 5000	57300 $\pm$ 1600	55800 $\pm$ 1800	63700 $\pm$ 1500
t4	38000 $\pm$ 1000	38000 $\pm$ 3000	27000 $\pm$ 1000	18900 $\pm$ 100
Mg ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	800 $\pm$ 3	—	—	—
t2	440 $\pm$ 3	430 $\pm$ 2	460 $\pm$ 1	440 $\pm$ 2
t3	510 $\pm$ 1	520 $\pm$ 1	550 $\pm$ 1	330 $\pm$ 2
t4	420 $\pm$ 1	440 $\pm$ 3	410 $\pm$ 1	430 $\pm$ 1
P ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	6400 $\pm$ 300	—	—	—
t2	5200 $\pm$ 1800	8500 $\pm$ 1600	7000 $\pm$ 2000	6100 $\pm$ 1500
t3	14600 $\pm$ 1400	13100 $\pm$ 300	12800 $\pm$ 600	13900 $\pm$ 800
t4	9800 $\pm$ 400	7800 $\pm$ 700	9200 $\pm$ 700	8400 $\pm$ 200

Tabela D.4: Concentração média dos macronutrientes Ca, K, Mg e P na parte aérea da planta de trigo duro, submetida a quatro tratamentos de adubação, em função dos diferentes tempos de colheita.

Colheita	[15] mL	[30] mL	[60] mL	[90] mL
Ca ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	1190 $\pm$ 10	—	—	—
t2	1500 $\pm$ 100	2620 $\pm$ 120	1840 $\pm$ 150	1900 $\pm$ 500
t3	4900 $\pm$ 200	9600 $\pm$ 1400	8000 $\pm$ 2000	12900 $\pm$ 1200
t4	8000 $\pm$ 1800	7600 $\pm$ 400	16200 $\pm$ 400	21400 $\pm$ 500
K ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	26500 $\pm$ 800	—	—	—
t2	53000 $\pm$ 5000	69000 $\pm$ 5000	58000 $\pm$ 6000	57000 $\pm$ 17000
t3	79300 $\pm$ 1300	83000 $\pm$ 2000	87000 $\pm$ 5000	102200 $\pm$ 1500
t4	77200 $\pm$ 1800	55000 $\pm$ 6000	48500 $\pm$ 1300	58800 $\pm$ 700
Mg ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	1140 $\pm$ 1	—	—	—
t2	800 $\pm$ 3	900 $\pm$ 2	1320 $\pm$ 3	1310 $\pm$ 1
t3	890 $\pm$ 8	1620 $\pm$ 10	950 $\pm$ 5	1000 $\pm$ 3
t4	1560 $\pm$ 5	1150 $\pm$ 4	1290 $\pm$ 2	1310 $\pm$ 2
P ( $\mu\text{g/g}$ )				
t1	5900 $\pm$ 100	—	—	—
t2	10300 $\pm$ 400	11300 $\pm$ 500	6300 $\pm$ 700	8000 $\pm$ 3000
t3	7700 $\pm$ 140	13200 $\pm$ 400	14100 $\pm$ 1100	13300 $\pm$ 300
t4	12600 $\pm$ 700	11600 $\pm$ 1100	14500 $\pm$ 600	1400 $\pm$ 100

Tabela D.5: Acumulação total de micronutrientes na raiz, parte aérea e grão de trigo, em função dos diferentes tempos de colheita e tratamentos de adubação aplicados.

Colheita	Tratamentos	Raiz	Parte Aérea	Grão de Trigo
Fe ( $\mu\text{g}$ )				
t1	Controlo	8,9	7,7	—
t2	[15] mL	23,5	189,8	—
	[30] mL	93,7	236,5	—
	[60] mL	26,4	125,5	—
	[90] mL	116,2	390,5	—
t3	[15] mL	20,0	99,9	—
	[30] mL	54,3	306,7	—
	[60] mL	119,6	291,6	—
	[90] mL	378,8	306,4	—
t4	[15] mL	25,9	310,0	214,3
	[30] mL	75,6	218,7	838,1
	[60] mL	261,7	156,4	376,9
	[90] mL	282,5	330,5	323,5
Cu ( $\mu\text{g}$ )				
t1	Controlo	1,2	1,5	—
t2	[15] mL	8,1	45,5	—
	[30] mL	16,4	104,3	—
	[60] mL	14,9	83,9	—
	[90] mL	34,7	92,8	—
t3	[15] mL	16,1	36,1	—
	[30] mL	20,6	74,4	—
	[60] mL	42,0	110,3	—
	[90] mL	40,6	57,1	—
t4	[15] mL	16,2	38,1	41,3
	[30] mL	34,7	105,8	176,8
	[60] mL	30,6	83,1	70,7
	[90] mL	36,2	136,7	48,5
Mn ( $\mu\text{g}$ )				
t1	Controlo	2,0	4,8	—
t2	[15] mL	9,0	62,5	—
	[30] mL	21,5	214,6	—
	[60] mL	46,3	421,8	—
	[90] mL	94,8	1409,9	—
t3	[15] mL	11,6	38,2	—
	[30] mL	16,2	202,6	—
	[60] mL	54,7	427,5	—
	[90] mL	59,4	1338,3	—
t4	[15] mL	8,1	92,5	142,9
	[30] mL	24,5	426,7	863,6
	[60] mL	42,9	2285,4	677,8
	[90] mL	147,0	995,9	453,0

Colheita	Tratamentos	Raiz	Parte Aérea	Grão de Trigo
Zn ( $\mu\text{g}$ )				
t1	Controlo	12,4	11,0	—
t2	[15] mL	50,0	656,1	—
	[30] mL	81,4	1150,0	—
	[60] mL	31,8	349,3	—
	[90] mL	61,3	775,1	—
t3	[15] mL	105,7	883,7	—
	[30] mL	92,5	1320,7	—
	[60] mL	95,7	1006,2	—
	[90] mL	82,6	722,7	—
t4	[15] mL	79,6	932,5	557,6
	[30] mL	57,6	1631,2	2098,3
	[60] mL	43,4	1585,5	1043,6
	[90] mL	55,4	1494,5	645,4

Tabela D.6: Acumulação total de macronutrientes na raiz, parte aérea e grão de trigo, em função dos diferentes tempos de colheita e tratamentos de adubação aplicados.

Colheita	Tratamentos	Raiz	Parte Aérea	Grão de Trigo
Ca (mg)				
t1	Controlo	0,3	0,2	—
t2	[15] mL	1,0	6,2	—
	[30] mL	6,1	20,2	—
	[60] mL	2,0	6,2	—
	[90] mL	5,9	16,3	—
t3	[15] mL	2,2	16,0	—
	[30] mL	8,2	70,0	—
	[60] mL	8,3	56,9	—
	[90] mL	15,3	95,6	—
t4	[15] mL	3,7	35,9	2,7
	[30] mL	11,4	68,0	11,1
	[60] mL	14,4	91,8	6,0
	[90] mL	22,5	238,3	6,8
K (mg)				
t1	Controlo	2,9	4,5	—
t2	[15] mL	10,9	214,4	—
	[30] mL	31,4	535,5	—
	[60] mL	11,1	196,7	—
	[90] mL	31,5	467,7	—
t3	[15] mL	32,6	256,0	—
	[30] mL	37,8	611,5	—
	[60] mL	44,1	612,7	—
	[90] mL	56,7	754,8	—
t4	[15] mL	16,5	344,4	25,6
	[30] mL	40,8	491,6	157,6
	[60] mL	18,9	275,1	52,2
	[90] mL	15,9	652,3	57,0
Mg (mg)				
t1	Controlo	0,1	0,2	—
t2	[15] mL	0,2	3,2	—
	[30] mL	0,3	6,9	—
	[60] mL	0,2	4,5	—
	[90] mL	0,4	10,8	—
t3	[15] mL	0,3	2,9	—
	[30] mL	0,3	11,8	—
	[60] mL	0,4	6,7	—
	[90] mL	0,3	7,4	—
t4	[15] mL	0,2	7,0	7,0
	[30] mL	0,5	10,3	34,9
	[60] mL	0,3	7,3	11,8
	[90] mL	0,4	14,6	11,3

Colheita	Tratamentos	Raiz	Parte Aérea	Grão de Trigo
P (mg)				
t1	Controlo	0,5	1,0	—
t2	[15] mL	2,4	41,9	—
	[30] mL	6,4	86,8	—
	[60] mL	2,3	21,3	—
	[90] mL	5,7	64,7	—
t3	[15] mL	7,0	24,9	—
	[30] mL	8,7	96,2	—
	[60] mL	10,1	99,9	—
	[90] mL	12,4	98,1	—
t4	[15] mL	4,2	56,3	25,6
	[30] mL	8,3	102,9	131,4
	[60] mL	6,4	82,2	56,0
	[90] mL	7,1	156,8	51,5

# Apêndice E

## Dados Associados à Técnica de $\mu$ -EDXRF: Eucalipto

Tabela E.1: Concentração dos elementos presentes na raiz da espécie *Eucalyptus globulus* aos 2 e aos 4 meses, após a contaminação do solo com 100  $\mu\text{g/g}$  de As. Os resultados são apresentados na forma  $\overline{X} \pm \sigma$ .

Elementos	Concentração (2 meses)	Concentração (4 meses)
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
P	$6300 \pm 500$	$6400 \pm 500$
S	$570 \pm 50$	$790 \pm 70$
Cl	$10700 \pm 900$	$2050 \pm 170$
K	$12900 \pm 1000$	$3100 \pm 200$
Ca	$3300 \pm 300$	$3900 \pm 300$
Cr	$7,0 \pm 0,6$	$6,00 \pm 0,05$
Mn	$10,0 \pm 0,8$	$10,0 \pm 0,8$
Fe	$210 \pm 17$	$34 \pm 3$
Ni	$4,0 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,2$
Cu	$16 \pm 1$	$12 \pm 1$
Zn	$115 \pm 9$	$85 \pm 7$
As	$0,70 \pm 0,06$	$1,00 \pm 0,08$

Tabela E.2: Concentração dos elementos presentes na raiz da espécie *Eucalyptus globulus* aos 2 e aos 4 meses, após a contaminação do solo com 200  $\mu\text{g/g}$  de As. Os resultados são apresentados na forma  $\bar{X} \pm \sigma$ .

Elementos	Concentração (2 meses)	Concentração (4 meses)
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
P	$9100 \pm 700$	$5720 \pm 500$
S	$2120 \pm 170$	$680 \pm 60$
Cl	$3100 \pm 200$	$15100 \pm 1200$
K	$7800 \pm 700$	$10200 \pm 800$
Ca	$11600 \pm 900$	$3100 \pm 200$
Cr	$10,0 \pm 0,8$	$4,0 \pm 0,3$
Mn	$22 \pm 2$	$6,0 \pm 0,1$
Fe	$175 \pm 15$	$33 \pm 3$
Ni	$5,0 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,3$
Cu	$20 \pm 2$	$14 \pm 1$
Zn	$140 \pm 10$	$116 \pm 10$
As	$30 \pm 2$	$1,0 \pm 0,1$

Tabela E.3: Concentração dos elementos presentes na raiz da espécie *Eucalyptus nitens* aos 2 e aos 4 meses, após a contaminação do solo com 100  $\mu\text{g/g}$  de As. Os resultados são apresentados na forma  $\bar{X} \pm \sigma$ .

Elementos	Concentração (2 meses)	Concentração (4 meses)
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
P	$7800 \pm 600$	$6600 \pm 500$
S	$580 \pm 50$	$780 \pm 60$
Cl	$5500 \pm 400$	$5200 \pm 400$
K	$5700 \pm 500$	$4200 \pm 300$
Ca	$2800 \pm 200$	$6200 \pm 500$
Cr	$6,0 \pm 0,5$	$8,0 \pm 0,6$
Mn	$5,0 \pm 0,4$	$9,0 \pm 0,7$
Fe	$32 \pm 3$	$30 \pm 2$
Ni	$4,0 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,2$
Cu	$15 \pm 1$	$13 \pm 1$
Zn	$110 \pm 10$	$95 \pm 8$
As	$0,50 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,04$



Tabela E.4: Concentração dos elementos presentes na raiz da espécie *Eucalyptus nitens* aos 2 e aos 4 meses, após a contaminação do solo com 200  $\mu\text{g/g}$  de As. Os resultados são apresentados na forma  $\bar{X} \pm \sigma$ .

Elementos	Concentração (2 meses)	Concentração (4 meses)
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
P	$7100 \pm 600$	$7200 \pm 600$
S	$570 \pm 50$	$740 \pm 60$
Cl	$10600 \pm 800$	$4200 \pm 300$
K	$12000 \pm 1000$	$6700 \pm 500$
Ca	$2900 \pm 200$	$3500 \pm 300$
Cr	$7,0 \pm 0,6$	$9,0 \pm 0,7$
Mn	$7,0 \pm 0,6$	$25 \pm 2$
Fe	$40 \pm 3$	$35 \pm 3$
Ni	$4,0 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,2$
Cu	$14 \pm 1$	$13 \pm 1$
Zn	$110 \pm 9$	$90 \pm 7$
As	$7,0 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0,1$

Tabela E.5: Concentração dos elementos presentes na folha da espécie *Eucalyptus nitens* aos 2 meses, após a contaminação do solo com 200  $\mu\text{g/g}$  de As. Os resultados são apresentados na forma  $\bar{X} \pm \sigma$ .

Elementos	Concentração (2 Meses)
	$\mu\text{g/g}$
P	$5900 \pm 500$
S	$910 \pm 70$
K	$2900 \pm 200$
Ca	$4600 \pm 400$
Ti	$10,0 \pm 0,8$
Cr	$5,0 \pm 0,4$
Mn	$50 \pm 4$
Fe	$40 \pm 3$
Ni	$2,0 \pm 0,2$
Cu	$4,0 \pm 0,3$
Zn	$80 \pm 6$
As	$0,30 \pm 0,03$